Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Qualitative Untersuchungen zum Stoffwechsel homologer Pyrazolonderivate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Wittemann
aus Lörrach

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0026

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Qualitative Untersuchungen zum Stoffwechsel homologer Pyrazolonderivate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Wittemann
aus Lörrach

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. K. Mörike

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Remmer

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-F. v. Oldershausen

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.

1. Einleitung 1

2. Ausgangspunkt der Arbeit: Bisherige Ergebnisse 4
   a) Phenazon-Stoffwechsel 4
   b) Aminophenazon-Stoffwechsel 5
   c) Stoffwechsel der übrigen Aminophenazon-Derivate 7
   d) Parallelen im Stoffwechsel von Phenazon und Aminophenazon: Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen 7

3. Übersicht über allgemeine Methodik und experimentelles Vorgehen 10
   A. Biochemisch-analytische Versuche 11
   B. Chemisch-präparativer Teil 13
   C. Qualitative chemische Versuche 13

II. Ergebnisse

A. Biochemischer Teil
   1. Phenazon-Stoffwechsel 14
      a) 4,5-Dioxopyrazolin im Hundeharn 14
      b) 4,5-Dioxopyrazolin im Humanharn 14
      c) Isolierung von 4,5-Dioxopyrazolin aus Humanharn 16
      d) Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Harn von Ratte und Kaninchen 16
      e) Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Blut von Mensch, Hund und Ratte sowie im Rattenleberhomogenat 18
      f) Stoffwechselversuche in vitro mit Rattenlebermikrosomen 18

   2. Stoffwechsel der Derivate des 4-Aminoantipyrin (Aminophenazon, Amizol, Metamizol, Isopropylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin) 19

   3. Stoffwechsel von Isopropylantipyrin 21

Seite

B. Präparativ-chemischer Teil
1. Synthesen von 4,5-Dioxopyrazolin 23
2. Synthese von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin 23
3. Darstellung der Methylrubazonsäure 24

C. Qualitative chemische Untersuchungen zur Reaktivität von 4,5-Dioxopyrazolin und 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin
1. Reaktionen von 4,5-Dioxopyrazolin mit Aminogruppen .. 25
a) Reaktion mit Ammoniak 25
b) Reaktion mit substituierten Aminen 26
c) Reaktion mit Aminosäuren 28
2. Reduktionsvermögen von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin ... 28
3. Prüfung von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin auf Endiolstruktur 30

III. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion
1. Phenazon-Stoffwechsel 32
a) Elimination von freiem 4,5-Dioxopyrazolin im Hundeharn 33
b) Elimination einer maskierten Form von 4,5-Dioxopyrazolin beim Menschen 34
c) Fehlender Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin bei Ratte und Kaninchen 34
d) Transportform von 4,5-Dioxopyrazolin im Blut 35
2. Stoffwechselverhalten der Derivate des 4-Aminoantipyrin 37
3. Diskussion einer gemeinsamen Wirkform 40

IV. Zusammenfassung 42

V. Experimenteller Teil
Allgemeine Methodik 45
Biochemische Versuche
1. 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonharn des Hundes 47
2. Versuche zum Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonharn des Menschen 48
3. Isolierung von 4,5-Dioxopyrazolin aus Phenazonharn ... 50
4. Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonharn von Ratte und Kaninchen 51
5. Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Blut von Mensch, Hund und Ratte sowie im Rattenleberhomogenat 51
6. Versuche mit Rattenlebermikrosomen 52

Seite

7. Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Humanharn nach Einnahme verschiedener Aminophenazon-Derivate 55

8. Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Isopropyl-antipyrin-Harn 56

Chemische Versuche

1. Synthesen von 4,5-Dioxopyrazolin und 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin 56

2. Reaktion von 4,5-Dioxopyrazolin mit Aminosäuren 58

3. Reduktionsproben mit 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin 59

4. Prüfung von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin auf Endiol-struktur 60

VI. Literaturverzeichnis 61

SYNONYMENVERZEICHNIS

Benützter Name	Systematischer Name
Phenazon	1-Phenyl-2,3-dimethyl-pyrazolon-(5)
Norphenazon	1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon-(5)
4-Hydroxyphenazon	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-hydroxy-pyrazolon-(5)
Aminophenazon	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-5-pyrazolon
4-Aminoantipyrin	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-5-pyrazolon
4-Acetylaminoantipyrin	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-acetylamino-5-pyrazolon
4-Monomethylamino-antipyrin	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-monomethylamino-5-pyrazolon
Amizol (= Normetamizol)	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon-(5)-N-methansulfonsäure
Metamizol	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-methylamino-pyrazolon-(5)-N-methansulfonsäure
Isopropylamino-antipyrin	4-Monoisopropylamino-1-phenyl-2,3-dimethylpyrazolon-(5)
Isopropylantipyrin	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-isopropyl-pyrazolon-(5)
4,5-Dioxopyrazolin	1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxopyrazolin
4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin	1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-oxo-pyrazolin

nach NEGWER 1966

I.

1. EINLEITUNG

Die umfangreiche Gruppe der heute verwendeten 1-Phenyl-2,3-dimethylpyrazolone geht auf die antipyretisch und analgetisch gut wirksamen Verbindungen Phenazon (Antipyrin^{R}) und Aminophenazon (Pyramidon^{R}) zurück (KROHS u. HENSEL 1961). Beide Arzneimittel wurden bereits vor der Jahrhundertwende in die Therapie eingeführt (FILEHNE 1896).

Durch systematische Abwandlung der Substituenten - besonders an C_4 des Pyrazolonringes - sind im Laufe der Zeit weitere brauchbare Arzneistoffe mit sehr ähnlichem Wirkungsspektrum aufgefunden worden, die im gesamten Arzneimittelverbrauch auch heute noch eine bedeutende Rolle spielen. Dies läßt sich aus der Zahl der Präparate abschätzen, in denen sie enthalten sind (HEILMEYER 1956, ROTHGANG 1961, NEGWER 1966, BERNOULLI-GORDONOFF-LEHMANN 1967).

Von den betrachteten Dimethylpyrazolonen abzutrennen ist die Gruppe der 3,5-Dioxopyrazoline, die hier nicht mit berücksichtigt werden.

Die derzeitigen Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus der Pyrazolonkörper ergeben kein einheitliches Bild. Dies überrascht bei dem breiten Wirkungsspektrum dieser Arzneimittelgruppe nicht, das von analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Wirkungen bis zur Spasmolyse reicht. Für die analgetische und antipyretische Wirkungsqualität werden zentrale Angriffspunkte angenommen, während für die antiphlogistische Wirkungsqualität periphere, lokale Effekte im Vordergrund stehen. Weitere Einzelheiten, auf die hier nicht eingegangen werden kann,

finden sich in der Literatur. Im Folgenden wird eine Zusammenstellung wesentlicher, z.T. zusammenfassender Arbeiten gegeben: BÖCK et al. 1935, BRUNS et al. 1950, DOMENJOZ 1955, TOMEK 1955, WILHELMI u. PULVER 1955, THEOBALD u. DOMENJOZ 1958, LAUBENDER 1960, HERXHEIMER u. STRESEMANN 1961, ZICHA et al. 1961, FRIMMER u. KRYCH 1963, WHITEHOUSE 1965, LECOMTE 1966, WINTER 1966, VARGAFTIG 1967.

Insgesamt ist die Wirkungsweise dieser Arzneimittelgruppe unter dem Gesichtspunkt molekularer Pharmakologie noch weitgehend ungeklärt. Die biochemische Pharmakologie hat jedoch auch hier gewisse Grundlagen zum Verständnis der Wirkungsmechanismen von Arzneimitteln geschaffen, die der physiologisch orientierten Forschung methodisch nicht zugänglich waren.

Besonders vielversprechend erscheint dabei die Berücksichtigung der Probleme der Biotransformation von Arzneimitteln. Durch Umsetzungen an den Enzymsystemen der Leberzelle werden aus einem applizierten Arzneimittel verschiedene Metaboliten gebildet, die in der Regel besser nierengängig sind als die Ausgangssubstanz. Zunächst nur als Entgiftungsvorgänge aufgefaßt (WILLIAMS 1959), hat sich gezeigt, daß durch biochemischen Umbau im Organismus eine Aktivierung einer zunächst biologisch inaktiven Substanz stattfinden kann (BRODIE u. AXELROD 1949, SMITH u. WILLIAMS 1949, GILLETTE et al. 1961, WEISBURGER 1963, MILLER u. MILLER 1966, BICKEL et al. 1967).
Ausgangspunkt dieser Erkenntnisse stellen Beobachtungen dar, daß solche Metaboliten häufig noch die gleiche oder eine ähnliche Wirkung zeigen wie ihre Ausgangssubstanzen (KOBERT 1907, BRODIE u. AXELROD 1950). Für viele Arzneimittel ist nach heutigem Wissen die Aktivierung durch Biotransformation sogar Voraussetzung für ihre pharmakologische Wirksamkeit (HARPER 1962), da erst hierbei die eigentlichen Wirkformen gebildet werden. Aber auch Nebenwirkungen von Arzneimitteln lassen sich mit Hilfe dieser Betrachtungsweise verstehen (REMMER u. SCHÜPPEL 1968).

Unter diesem Aspekt sind - wie unten näher ausgeführt - Befunde besonders bemerkenswert, die im Stoffwechsel der hier betrachteten Pyra-

zolonderivate gewisse stoffliche wie auch kinetische Parallelen erkennen lassen (HALBERKANN u. FRETWURST 1950, BRODIE u. AXELROD 1950, SCHÜPPEL 1966). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das übereinstimmende Wirkungsspektrum der homologen Reihe der Pyrazolonderivate durch einen uniformen Metaboliten als Wirkform bedingt sein könnte. Allfällige Modalitäten der Wirkung in vivo ließen sich dann durch unterschiedliche Bildungskinetik der Wirkform aus den jeweiligen Stammverbindungen erklären, was in erster Linie vom Verteilungsmodus der betreffenden Substanz im Organismus abhinge.

Die vorliegende Arbeit gilt der Prüfung dieser Arbeitshypothese, derzufolge ein gemeinsamer Metabolit im Stoffwechsel der betrachteten Pyrazolonkörper das mehr oder weniger einheitliche Wirkungsbild dieser verschiedenen Substanzen vermittelt.

Folgende Ansätze schienen für diesen Zweck geeignet:
Der spezielle Stoffwechsel von Phenazon und Aminophenazon sollte einer weiteren Aufklärung zugeführt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte besonderes Gewicht auf den Nachweis eines bislang nicht bekannten Metaboliten gelegt werden, der sich aus beiden genannten Substanzen ableiten ließ. Über die Struktur dieses gesuchten Metaboliten konnten - wie noch zu zeigen ist - aus den bisher vorliegenden Befunden über den Pyrazolonstoffwechsel bereits bestimmte Aussagen gemacht werden. Zusätzlich sollte dieser Metabolit auch als Biotransformationsprodukt anderer z.T. komplizierter gebauter Derivate der 2,3-Dimethylpyrazolonreihe nachgewiesen werden.

Zunächst seien jedoch in einem Abriß die z.Zt. gesicherten Ergebnisse der Stoffwechselstudien der betrachteten Pyrazolonderivate dargestellt. Dabei werden vor allem die Parallelen im Stoffwechsel, d.h. gleichartige Reaktionen am Molekül und gemeinsame Metaboliten, hervorzuheben sein. Daraus ergeben sich dann die Ansatzpunkte für die speziellen Fragestellungen dieser Arbeit sowie für das geeignete experimentelle Vorgehen.

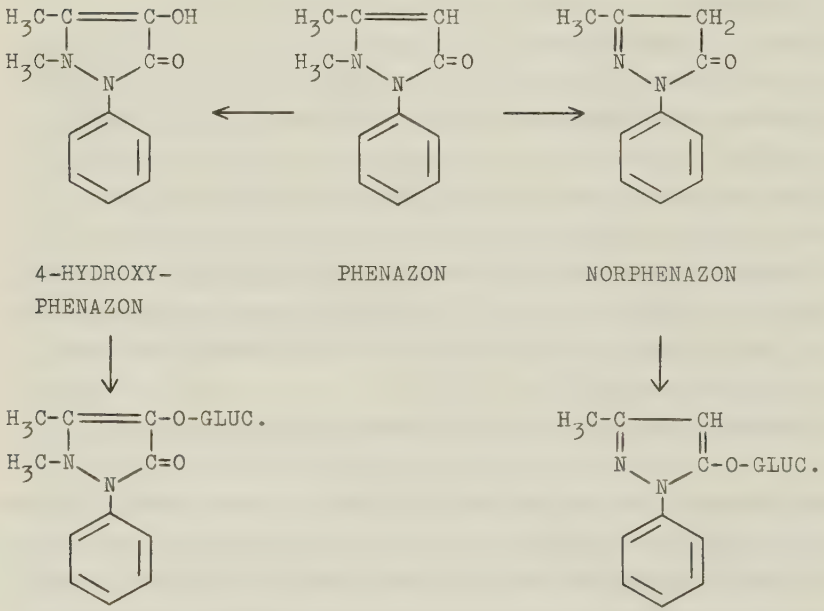
2. AUSGANGSPUNKT DER ARBEIT: BISHERIGE ERGEBNISSE

a) Phenazon - Stoffwechsel

Beim Phenazon, dem einfachsten Glied in der homologen Reihe der Pyrazolonderivate, sind zwei hauptsächliche Stoffwechselwege bekannt (HALBERKANN u. FRETWURST 1950, BRODIE u. AXELROD 1950, SCHÜPPEL 1966):

1) Hydroxylierung an C_4 zu 4-Hydroxyphenazon (bzw. Glucuronid)
2) Demethylierung an N_2 zu Norphenazon (bzw. Glucuronid).

STOFFWECHSEL-SCHEMA VON PHENAZON



Weiter ist bekannt, daß diese beiden Hauptmetaboliten des Phenazons - als freie Substanzen appliziert - neben der überwiegenden Konjugation noch weiterem oxydativem Abbau unterliegen (SCHÜPPEL 1969). Dabei wird 4-Hydroxyphenazon selbst zu etwa 67% an Glucuronsäure konjugiert, der Rest von 33% oxydativ abgebaut. Norphenazon wird zu 40 - 50% als Konjugat ausgeschieden, der Rest auf andere Weise eliminiert. Die Natur der jeweiligen oxydativen Endprodukte ist bisher ungeklärt.

Neuerdings wurde von japanischen Autoren über einen weiteren Stoffwechselweg des Phenazons berichtet (HIDETOSHI YOSHIMURA et al. 1968). Danach findet eine Hydroxylierung der Methylgruppe an C_3 zu 3-Hydroxymethylphenazon statt.

b) Aminophenazon-Stoffwechsel

Der Stoffwechsel des Aminophenazons läuft nach den bisherigen Ergebnissen folgendermaßen ab (JAFFE 1901, LAWROW 1901, HALBERKANN u. FRETWURST 1950, BRODIE u. AXELROD 1950, PECHTOLD 1964, PREUSS u. VOIGT 1965, SCHÜPPEL u. SOEHRING 1965, VECERKOVA et al. 1967):

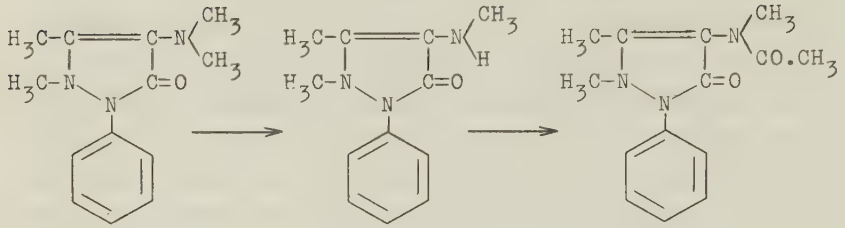
1) Stufenweise Demethylierung der Aminofunktion an C_4 zu 4-Monomethylaminoantipyrin und 4-Aminoantipyrin.

2) Acetylierung eines Teils des gebildeten primären Amins zu 4-Acetylaminoantipyrin sowie des sekundären Amins zu 4-Acetyl-4-methylaminoantipyrin.

3) Oxydative Desaminierung an C_4 unter Bildung von 4-Hydroxyantipyrin, welches als Glucuronid ausgeschieden wird.

4) Teilweise oxydative N_2-Demethylierung am Pyrazolonring selbst. Diese Reaktion führt zu den aufgefundenen Pigmenten Rubazonsäure und Methylrubazonsäure. Hier sind zwei Pyrazolonringe - ganz oder teilweise N_2-demethyliert - über eine Stickstoffbrücke dimerisiert. Sie werden meist als sekundäre Ausscheidungsprodukte angesprochen, da sie sich im frischen Aminophenazonharn z.T. erst beim Stehen an der Luft bilden. Dieses Verhalten deutet auf noch unbekannte Vorstufen als weitere Primärmetaboliten hin.

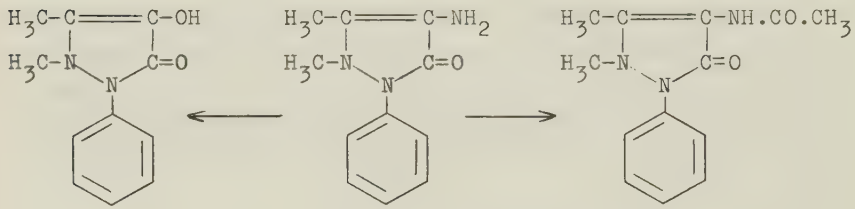
STOFFWECHSEL-SCHEMA VON AMINOPHENAZON



AMINOPHENAZON

4-MONOMETHYL-AMINOANTIPYRIN

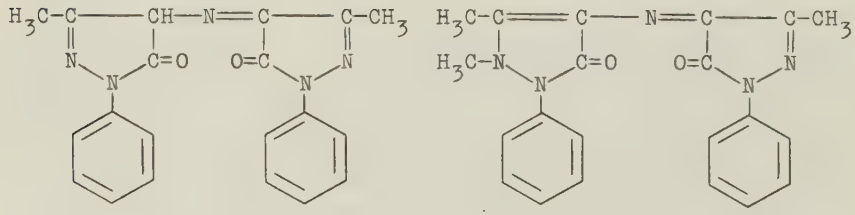
4-METHYL-ACETYL-AMINOANTIPYRIN



4-HYDROXY-ANTIPYRIN

4-AMINO-ANTIPYRIN

4-ACETYL-AMINOANTIPYRIN



RUBAZONSÄURE

METHYLRUBAZONSÄURE

Die hier angegebenen Stoffwechselwege bzw. ihre Metaboliten umfassen etwa 55-70% der zugeführten Aminophenazon-Menge. Ein beträchtlicher Teil des Aminophenazons muß daher auf noch unbekannten Stoffwechselwegen eliminiert werden, denn unverändertes Aminophenazon wird im Harn nur zu einem sehr geringen Teil ausgeschieden (2-5%). Auch diese Tatsache rechtfertigt den Versuch, nach weiteren Metaboliten zu fahnden.

c) Stoffwechsel der übrigen 4-Aminophenazonderivate

Bei den bisher untersuchten Derivaten des Aminophenazons zeigten sich dem obigen Schema weitgehend analoge Stoffwechselwege, nämlich Entalkylierung und Acetylierung der Aminogruppe an C_4 sowie Demethylierung an N_2. So fanden HALBERKANN u. FRETWURST (1950) als Metaboliten des Metamizols (Novalgin^R) und Normetamizols (Melubrin^R) bisher 4-Aminoantipyrin und 4-Acetylaminoantipyrin. Nach Einnahme von 4-Aminoantipyrin konnten sie im Harn diese Substanz sowohl in unveränderter als auch in acetylierter Form nachweisen. An Hunde verabreichtes 4-Acetylaminoantipyrin wurde dagegen nur in unverändertem Zustand ausgeschieden.

Bei Untersuchungen von RICHARZ, SCHOETENSACK u. VOGEL (1961) am Isopropylaminoantipyrin (Isopyrin^R) konnten 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin und Rubazonsäure als Metaboliten nachgewiesen werden; außerdem zeigte sich ein Anstieg der Glucuronsäureausscheidung.

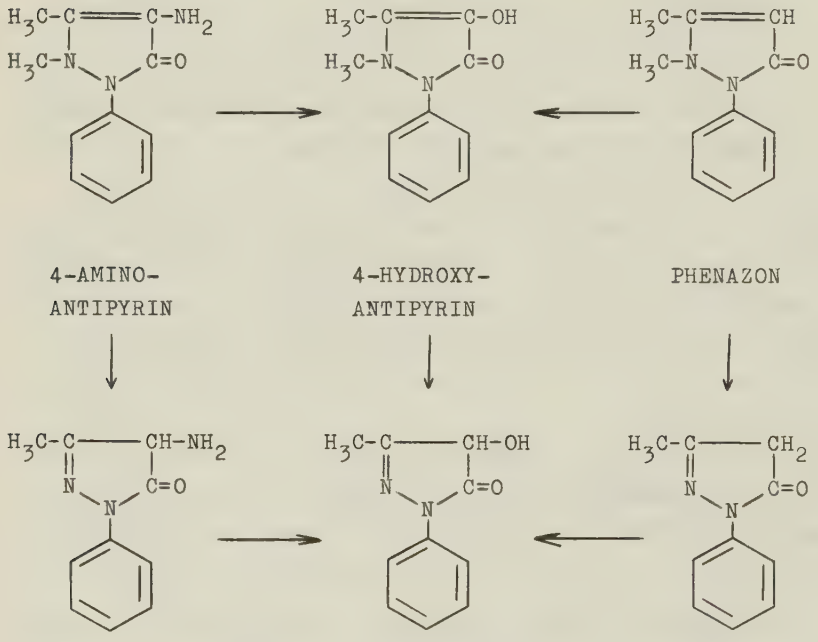
d) Parallelen im Stoffwechsel von Phenazon und Aminophenazon: Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen

Zusammenfassend ergibt sich als kennzeichnende Parallelität:
1) In der Reihe der C_4-amino-substituierten Pyrazolonderivate führt die oxydative Desaminierung zur 4-Hydroxy-Funktion. Dasselbe wird beim Phenazon durch C_4-Hydroxylierung erreicht. Ergebnis: 4-Hydroxyantipyrin.
2) Für beide Gruppen läuft eine mehr oder weniger ausgeprägte

N-Demethylierung am N_2 des Pyrazolonringes ab.

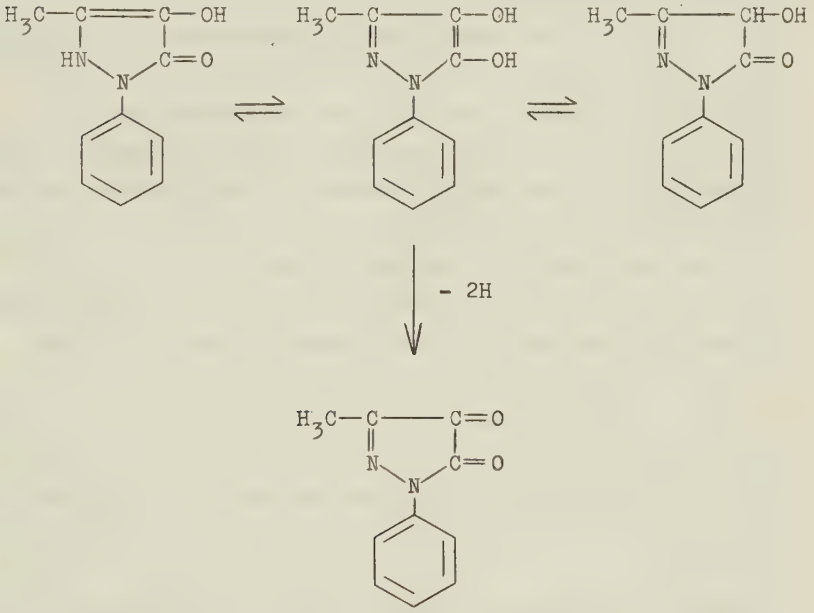
Sie führt bei Phenazon zu Norphenazon, bei der C_4-Aminosubstitution zu den noch unbekannten Vorstufen der charakteristischen Metaboliten Rubazonsäure und Methylrubazonsäure.

PARALLELEN IM STOFFWECHSEL VON PHENAZON
UND DEN DERIVATEN DES 4-AMINOANTIPYRIN



Damit sind zwei Reaktionsschritte gegeben, die offenbar unabhängig voneinander an den Molekülen ablaufen können.
Die Kombination dieser beiden Reaktionen am selben Molekül läßt nun die Struktur eines neuen Biotransformationsproduktes erwarten, das sowohl an C_4 hydroxyliert als auch an N_2 demethyliert ist und damit ein 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxypyrazolon-5 ergibt.

Eine orientierende Betrachtung dieser Verbindung läßt verschiedene tautomere Formen erwarten, die wir hier angeben:



In jeder dieser Formen ist eine Stabilisierung mit Acylresten denkbar (MARKS u. HECKER 1968), oder aber weitergehender Umbau z.B. durch Oxydation. Dazu ist besonders die Endiolform (Form 2) geeignet (Redukton), aus welcher durch Dehydrierung 1-Phenyl-3-methyl-4,5-dioxopyrazolin als Endprodukt hervorgeht (siehe Abb.). Es ist allerdings bekannt, daß diese Verbindung, namentlich in leicht alkalischer

Lösung, einer Ringöffnung zu der ß-Phenylhydrazino-α-keto-buttersäure unterliegt, die in vivo dem oxydativen Endabbau zugeführt werden und damit dem Nachweis entgehen könnte.

Entsprechend diesen Überlegungen haben sich unsere Untersuchungen auf das 4,5-Dioxopyrazolin bzw. dessen Dihydroprodukt gerichtet. Dieser Metabolit kann in besonders übersichtlicher Reaktionsfolge aus Phenazon entstehen. Bei dieser Verbindung ist infolge des Fehlens einer Aminogruppe an C_4 keine Möglichkeit zu Sekundärreaktionen mit eventuell vorhandenen weiteren aktiven Metaboliten gegeben, wie uns das vom Stoffwechsel des Aminophenazon her bekannt ist (JAFFE 1901).

Aber auch die Derivate der C_4-Aminogruppe können durch bereits gesicherte Schritte den beschriebenen Metaboliten liefern.

Damit ergab sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzung:

1. den Nachweis zu führen, daß 4,5-Dioxopyrazolin selbst oder seine reduzierte Form im Stoffwechsel von Phenazon, Aminophenazon und den übrigen untersuchten Derivaten gebildet werden.

2. beide Substanzen synthetisch darzustellen.

3. deren chemische Reaktionsfähigkeit orientierend festzulegen. Nach der Struktur war hier eine besondere Reaktionsfähigkeit zu erwarten.

3. ALLGEMEINE METHODIK UND EXPERIMENTELLES VORGEHEN

Entsprechend der obigen Zielsetzung der Arbeit ergibt sich folgende methodische Gliederung:

A. Ein biochemisch-analytischer Teil, in dem der Nachweis, die Identifizierung und Isolierung der besprochenen Metaboliten durchgeführt wird.

B. Ein chemisch-präparativer Teil, der die Darstellung der benötigten Referenzsubstanzen behandelt.

C. Chemische Versuche, in denen die Reaktivität des aufgefundenen

Metaboliten näher charakterisiert wird.

Die genauen Versuchsbeschreibungen sind in einem experimentellen Teil zusammengefaßt, welcher sich am Schluß der Arbeit findet. Im Folgenden soll zunächst nur ein Überblick gegeben werden.

A. Biochemisch-analytische Versuche

In den Versuchsreihen mit Phenazon wurden Harnproben von Mensch, Hund, Ratte und Kaninchen auf die entsprechenden Metaboliten untersucht. Dazu wurden Nativharn und vorextrahierte Harnproben nach Salzsäure- und Schwefelsäurehydrolyse verwendet und nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln unter Vergleich mit synthetischen Referenzsubstanzen dünnschichtchromatographisch analysiert.

Zur Identifizierung des neuen Metaboliten wurde der Versuch einer mikropräparativen Darstellung aus menschlichem Phenazonharn unternommen. Dazu wurden die Harnextrakte einer mehrfachen dünnschichtchromatographischen Reinigung und einer Vakuumsublimation unterzogen. Die Identitätsprüfung erfolgte mittels IR-Spektrum und Mischschmelzpunkt.

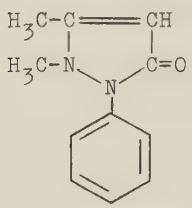
Versuche zum Nachweis des Metaboliten im Vollblut, Serum und Blutkuchen von Mensch, Hund und Ratte sowie im Rattenleberhomogenat wurden mit gleicher Methodik wie im Harn durchgeführt.

Ferner wurden mit Phenazon Versuche zur Darstellung seiner Metaboliten in vitro unter Verwendung von Luminal-stimulierten Rattenlebermikrosomen vorgenommen.

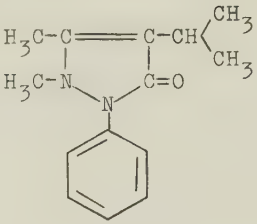
Im Anschluß an die Untersuchungen am Phenazon wurde der Nachweis des vermuteten Metaboliten auch im Stoffwechsel folgender Pyrazolonderivate versucht:
Aminophenazon (Pyramidon^{R}), Metamizol (Novalgin^{R}), Normetamizol (Melubrin^{R}), Isopropylaminoantipyrin (Isopyrin^{R}), 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin und Isopropylantipyrin.

Bei den C_4-aminosubstituierten Derivaten mußte vor der Säurehydrolyse zur Vermeidung von Artefakten eine Extraktion bereits bekannter dimerer Metaboliten vorgenommen werden.

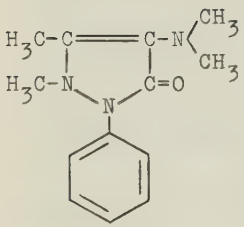
UNTERSUCHTE PYRAZOLON-5-DERIVATE



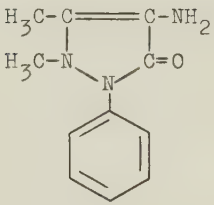
ANTIPYRIN



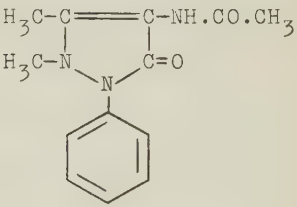
ISOPROPYL-
ANTIPYRIN



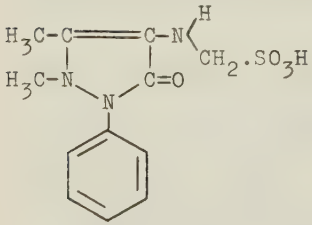
PYRAMIDON



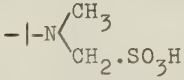
4-AMINO-
ANTIPYRIN



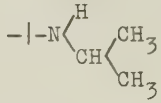
4-ACETYL-
AMINOANTIPYRIN



MELUBRIN



NOVALGIN



ISOPYRIN

B. Chemisch-präparativer Teil

Hier werden die Synthesen für die benötigten Metaboliten beschrieben. Folgende Substanzen wurden präparativ dargestellt:

1. 4,5-Dioxopyrazolin auf drei verschiedenen Wegen.
2. 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-pyrazolin.
3. Methylrubazonsäure.

Sie wurden in erster Linie als Referenzsubstanzen in der dünnschichtchromatographischen Analyse verwendet. Ferner wurden sie für verschiedene qualitative chemische Reaktionen benötigt, die zur Kennzeichnung typischer Reaktionsweisen der Metaboliten dienten.

Die übrigen benützten Referenzsubstanzen standen von früheren Arbeiten her zur Verfügung (SCHÜPPEL u. SOEHRING 1965).

C. Qualitative chemische Versuche

Da sowohl der aufgefundene Metabolit 4,5-Dioxopyrazolin als auch sein biologischer Präkursor 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin jeweils verschiedene kennzeichnende und u.U. biochemisch wichtige Reaktivitäten erwarten ließen, wurde mit qualitativen Prüfungen das Reaktionsvermögen der beiden Substanzen untersucht.

Dabei wurde 4,5-Dioxopyrazolin als α-Diketon bzw. als atypisches o-chinoides System in erster Linie auf seine Reaktivität gegenüber Aminogruppen untersucht.

1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-oxopyrazolin als α-Ketol bzw. Endiol wurde auf seine reduzierenden Eigenschaften und seinen Enolisierungsgrad geprüft.

II. ERGEBNISSE

A. BIOCHEMISCHER TEIL

1. Phenazon-Stoffwechsel

a) 4,5-Dioxopyrazolin im Hundeharn

Nach Phenazongabe konnte im Hundeharn 4,5-Dioxopyrazolin in freier Form in größerer Menge nachgewiesen werden. Dazu wurde frischer Phenazonharn mit Benzol ohne jegliche Vorbehandlung extrahiert und der Extrakt dünnschichtchromatographisch untersucht.

Neben 4,5-Dioxopyrazolin fanden sich in diesen Harnproben reichlich freies Norphenazon und freies 4-Hydroxyphenazon. Dieser Befund zeigt, daß beide bisher bekannten Hauptmetaboliten, die beim Menschen und bei der Ratte als Glucuronide im Harn eliminiert werden, beim Hund zum größten Teil unkonjugiert vorliegen. Im Serum des Hundes sind jedoch beide Metaboliten erst nach Hydrolyse faßbar. Dies legt den Schluß nahe, daß beim Hund die genuinen Glucuronide in den ableitenden Harnwegen durch eine aktive ß-Glucuronidase mehr oder weniger quantitativ gespalten werden. In Analogie dazu ließe sich die Anwesenheit von freiem 4,5-Dioxopyrazolin im Hundeharn damit erklären, daß das zugehörige 4-Hydroxypyrazolon-Glucuronid bereits im Harn hydrolysiert wird unter gleichzeitiger Oxydation zu 4,5-Dioxopyrazolin.

b) Dioxopyrazolin im Humanharn

Beim Menschen ließ sich nach Phenazongabe weder im unbehandelten Nativharn, noch nach Hydrolyse mit Salzsäure bis zu 10% Endkonzentration,

die zur Spaltung normaler Glucuronide regelmäßig ausreicht, 4,5-Dioxopyrazolin nachweisen. Ebensowenig erfolgreich waren Versuche zur enzymatischen Spaltung eventuell vorhandener Glucuronide mittels ß-Glucuronidase im Totalharn. Auch die Isolierung der Harnglucuronid- bzw. -sulfatfraktion mittels Bleiacetatfällung (WILLIAMS 1952) und anschließende Aufarbeitung der abgetrennten Gesamtglucuronide blieb erfolglos.
Damit darf als erwiesen gelten, daß beim Menschen der fragliche Metabolit nicht als Glucuronid bzw. Sulfat eliminiert wird.

Mit diesen verschiedenen Methoden gelang der Nachweis des erwarteten 4,5-Dioxopyrazolins oder seines Dihydroproduktes nicht. Erst bei energischer Hydrolyse des Phenazonharnes mit Schwefelsäure (30 Vol% Endkonzentration) ließ sich 4,5-Dioxopyrazolin auch hier nachweisen. Dabei zeitigten wesentlich schwächere als auch wesentlich stärkere Konzentrationen an Schwefelsäure nur ungünstigere Resultate. Die Extraktion von 4,5-Dioxopyrazolin aus dem stark sauren Medium gelingt gut und unter diesen Bedingungen praktisch vollständig mit Benzol. Äther ist ungeeignet.

Zur Kontrolle, ob durch die verwendete Aufarbeitungsmethode mit konzentrierter Schwefelsäure 4,5-Dioxopyrazolin nicht etwa aus den bereits bekannten Metaboliten von Phenazon gebildet wird, wurden analoge Hydrolyse- und Extraktionsversuche mit Leerharn durchgeführt, denen Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon zugesetzt wurden. Alle Kontrollversuche verliefen negativ. Damit kann ein Artefakt ausgeschlossen werden.

4,5-Dioxopyrazolin wird demnach beim Menschen in einer "maskierten" Form ausgeschieden, die hochpolar ist und sich mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahieren läßt. Erst durch energische Säurehydrolyse wird 4,5-Dioxopyrazolin daraus freigesetzt. Nach den genannten Ergebnissen handelt es sich dabei jedoch nicht um eine normale Glucuronid- oder Sulfatbindung.

Eine Bindung an Mucoproteide des Harnes ließ sich durch eine Fällung mit Äthanol (RIMINGTON 1940) und getrennte Aufarbeitung der gefällten Mucoproteide ausschließen.

Die Struktur der gebundenen Form von 4,5-Dioxopyrazolin bleibt zunächst noch ungeklärt. Einige theoretische Möglichkeiten sollen bei der Besprechung der Ergebnisse (Teil III) diskutiert werden.

c) Isolierung von 4,5-Dioxopyrazolin aus Humanharn

Zur genauen chemischen Identifizierung wurde der Metabolit nach Phenazongabe aus sechs Litern entsprechend hydrolysiertem Humanharn mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert. Dazu wurde der Sammelurin von zwei Versuchspersonen verwendet, die über drei Tage 3 x täglich 0,75g Phenazon eingenommen hatten. Nach dreimaliger Dünnschichtchromatographie der Harnextrakte, Sublimation unter vermindertem Druck und Umkristallisation aus Ligroin wurden etwa 3mg der Substanz gewonnen: braunrote, stark glänzende, etwas verfilzte Kristallnädelchen mit einem Schmelzpunkt von 118-121°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem 4,5-Dioxopyrazolin, das auf drei verschiedenen Synthesewegen dargestellt wurde, lag bei 118-120°C. Das UV-Absorptionsspektrum hatte in wässriger Lösung (4mcg/ml) ein breites Maximum bei 232nm. Auch das IR-Spektrum (KBr-Preßling, Leitz-IR-Gerät mit Mikroeinrichtung) zeigte mit dem authentischen Vergleichspräparat gute Übereinstimmung (siehe Abbildung).

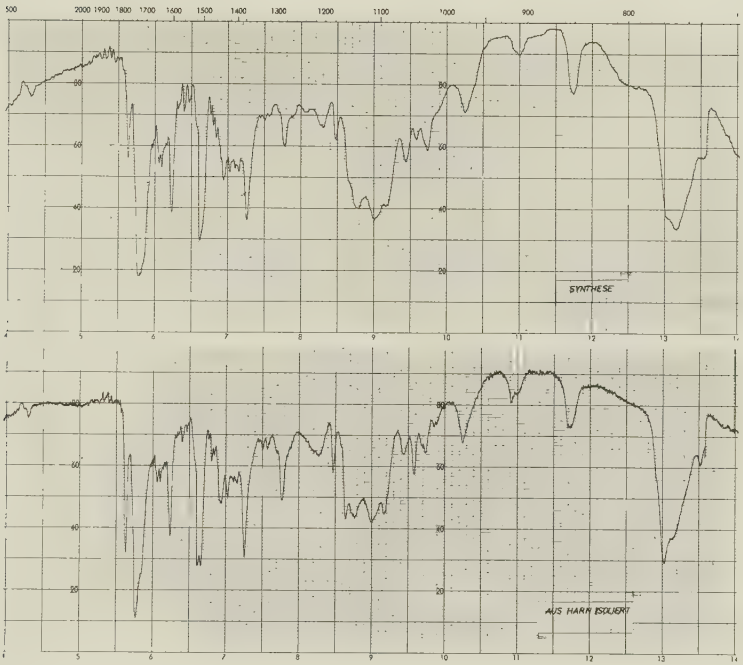
d) Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Harn von Ratte und Kaninchen

Bei der Ratte und beim Kaninchen konnte nach Phenazongabe weder im unbehandelten Nativharn noch nach Hydrolyse mit Salzsäure und konzentrierter Schwefelsäure 4,5-Dioxopyrazolin nachgewiesen werden. Die übrigen Metaboliten Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon fanden sich nach Hydrolyse jeweils in reichlicher Menge.

Hier liegt möglicherweise ein weiteres Beispiel artspezifischer Unterschiede im Arzneimittelstoffwechsel vor. Dabei wäre wohl in erster Linie eine Ringspaltung des intermediär noch gebildeten Dioxopyrazolins in Betracht zu ziehen, welches auf diese Weise dem oxidativen Endabbau zugänglich würde (Cf. Teil III).

Vergleichende Abbildung der IR-Spektren

von aus Harn isoliertem und synthetischem 4,5-Dioxopyrazolin



e) Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Blut von Mensch, Hund und Ratte sowie im Rattenleberganzhomogenat

Im Blut aller untersuchten Spezies sowie im Leberhomogenat der Ratte konnte 3-5h nach Phenazongabe weder 4,5-Dioxopyrazolin noch eine entsprechende Transportform gefunden werden. Dabei wurden Plasma und Erythrocyten getrennt voneinander aufgearbeitet und jeweils drei Extraktionsstufen unterworfen:

1) direkte Extraktion des biologischen Materials mit Chloroform
2) Extraktion nach Salzsäurehydrolyse mit Benzol
3) Extraktion nach Schwefelsäurehydrolyse mit Benzol

Die gleiche Aufarbeitung wurde für das Leberhomogenat durchgeführt.

Das negative Ergebnis bedarf einer Erklärung, zumal die übrigen erwarteten Metaboliten Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon stets neben unverändertem Phenazon nachgewiesen werden konnten. Als hauptsächliche Ursachen kommen dafür in Betracht:

1) relative Unempfindlichkeit der Nachweismethodik,
2) zu große Reaktivität des Metaboliten, die den Nachweis in dem vorliegenden proteinreichen Material verhindert (GUTMAN und NAGASAWA 1960, BELMAN u. TROLL 1961).
3) Zusammenwirken dieser beiden Faktoren.

f) Stoffwechselversuche in vitro mit Rattenlebermikrosomen

Neben dem Versuch eines Nachweises von 4,5-Dioxopyrazolin in Blut und Gewebe haben wir auch geprüft, ob dieser Metabolit in vitro von den Lebermikrosomen der Ratte gebildet werden kann. Nach vorausgegangener dreitägiger Stimulierung der Tiere mit Phenobarbital wurden Lebermikrosomen nach einem von REMMER u. GREIM (1967) angegebenen Verfahren präpariert. Als Substrate wurden Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon (Konz. 1×10^{-3} m) eingesetzt, alle drei biochemische Vorstufen des gesuchten 4,5-Dioxopyrazolins.

Nach 60minütiger Inkubation ließen sich im Phenazon-Ansatz qualitativ zwar geringe Mengen von 4-Hydroxyphenazon und Norphenazon nachweisen, 4,5-Dioxopyrazolin wurde jedoch nicht aufgefunden.

Dieses negative Ergebnis muß jedoch zurückhaltend beurteilt werden. Wir konnten nämlich mittels UV-Spektroskopie zeigen, daß 4,5-Dioxopyrazolin, dessen Alkalilabilität bereits lange bekannt ist (KNORR 1887), erst von pH 6,5 an abwärts in wässerigem Milieu stabil ist. In dem zur Inkubation verwendeten TRIS-Puffer von pH 7,5 wird es dagegen unter Ringöffnung zur α-Keto-ß-phenylhydrazinobuttersäure rasch zersetzt. Auf diese Tatsache führen wir das negative Versuchsergebnis zurück.

2. Stoffwechsel der Derivate des 4-Aminoantipyrin

Mit der ausgearbeiteten Methode zum Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im menschlichen Phenazonharn wurden nun auch Versuche nach Gabe folgender Pyrazolonderivate mit einer Aminofunktion an C_4 durchgeführt: Aminopyrin (Pyramidon^R), Metamizol (Novalgin^R), Normetamizol (Melubrin^R), Isopropylaminoantipyrin (Isopyrin^R), 4-Aminoantipyrin und Acetylaminoantipyrin.

Für jedes Arzneimittel standen zwei Versuchspersonen zur Verfügung, die jeweils eine einmalige Dosis von ca. 20mg/kg der entsprechenden Reinsubstanz (bei Acetylaminoantipyrin 30mg/kg) erhielten. Die 12h-Sammelurine wurden zunächst durch mehrfache Chloroformextraktion vollständig von Rubazonsäure und Methylrubazonsäure befreit, um bei der nachfolgenden Schwefelsäurehydrolyse die Bildung von 4,5-Dioxopyrazolin durch Spaltung dieser beiden Farbstoffe zu verhindern.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß Chloroformextrakte, die zunächst keine Rubazon- und Methylrubazonsäure mehr enthielten, sich nach kurzer Zeit durch Methylrubazonsäure-Nachbildung wieder rot anfärbten. Auch im Harn findet eine allmähliche Neubildung von Rubazonsäure und Methylrubazonsäure satt. Dies weist auf das Vorhandensein einer bis jetzt noch unbekannten Vorstufe der beiden Pigmente hin, wie bereits in der Einleitung erörtert wurde.
Das Problem der Farbstoffbildung im Aminophenazonharn soll zusammenfassend in der Diskussion (Teil III) besprochen werden.

Der mit Chloroform vorextrahierte Harn wurde anschließend einer sofortigen Schwefelsäurehydrolyse unterzogen, um einer Nachbildung von Rubazonsäure und Methylrubazonsäure im Harn zuvorzukommen. Das Hydrolysat wurde jeweils mehrfach mit Benzol extrahiert. 4-Aminoantipyrin kann dabei infolge Salzbildung in dem stark sauren Medium nicht in die Benzolphase übergehen, so daß auch im organischen Lösungsmittel eine Nachbildung von Methylrubazonsäure ausgeschlossen ist.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der einzelnen Extrakte erbrachte für alle genannten 4-Aminoantipyrin-Derivate den Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin. Die Möglichkeit von Artefakten konnte auch hier durch entsprechende Versuche mit Leerharn und den jeweils getrennt zugesetzten Metaboliten der Aminophenazonreihe Monomethylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin, 4 Hydroxyantipyrin und 1-Phenyl-3-methyl-4-aminopyrazolon-5 (als Zinnsalz) ausgeschlossen werden.

Neben der Bildung von 4,5-Dioxopyrazolin waren aber auch die übrigen teilweise schon bekannten Stoffwechselwege der einzelnen Derivate von Interesse. Wir untersuchten deshalb die Chloroformextrakte der Nativharne dünnschichtchromatographisch auf die Metaboliten Monomethylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, Acetylaminoantipyrin, Rubazonsäure und Methylrubazonsäure. Anschließend wurden die Harne einer milden Salzsäurehydrolyse unterworfen, um auch das als Glucuronid ausgeschiedene 4-Hydroxyantipyrin zu erfassen.

Diese Untersuchungen erbrachten im wesentlichen eine Bestätigung der Ergebnisse früherer Arbeiten (HALBERKANN u. FRETWURST 1950, PECHTOLD 1964, SCHÜPPEL u. SOEHRING 1965, VECERKOVA et al. 1967, RICHARZ et al. 1961). Daneben konnten jedoch einige bisher nur beim Pyramidon beschriebene Stoffwechselwege auch für die untersuchten Analogpräparate nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die bei den einzelnen 4-Aminoantipyrinderivaten von uns aufgefundenen Metaboliten in übersichtlicher Form zusammengestellt.

	Methylrubazonsäure	Rubazonsäure	4-Methylaminoantipyrin	4-Aminoantipyrin	4-Acetylaminoantipyrin	4-Hydroxyantipyrin	4,5-Dioxopyrazolin
Pyramidon^{R}	+	+	+	+	+	+	+
Melubrin^{R}	+	+	-	+	+	+	+
Novalgin^{R}	+	+	+	+	+	+	+
Isopyrin^{R}	+	+	-	+	+	+	+
Aminoantipyrin	+	+	-	+	+	+	+
Acetylaminoantipyrin	-	-	-	+	+	-	+

3. Stoffwechsel von Isopropylantipyrin

Als weiteres Derivat von Phenazon wurde das Isopropylantipyrin (Larodon^{R}) in die Untersuchungen einbezogen, das in zahlreichen Kombinationspräparaten enthalten ist (Saridon^{R}, Melabon^{R}). Eine Metabolisierung dieser Substanz zu 4,5-Dioxopyrazolin könnte über die oxidative Desalkylierung der Isopropylseitenkette erfolgen, doch ist ein solcher Stoffwechselweg bisher nicht nachgewiesen.

Auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit der Substanz mußte Isopropylantipyrin in Gelatinekapseln oder in Carboxymethylcellulose-Suspension verabreicht werden.

Schwefelsäurehydrolyse (30 Vol%) von Humanharn nach Einnahme von 1g Isopropylantipyrin führte zu keinem sicheren Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Benzolextrakt. Wegen der unangenehm starken Reizwirkung auf die Magenschleimhaut wurde eine höhere Dosierung (2,0g) nur einmal gewählt. Nach Aufarbeitung des dabei gewonnenen Harnes glaubten wir,

den gesuchten Metaboliten mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Dünnschichtplatte identifizieren zu können.

Versuche an Hunden konnten nicht ausgewertet werden, da die Tiere regelmäßig nach oraler Isopropylantipyrin-Applikation erbrachen.

B. PRÄPARATIV-CHEMISCHER TEIL

1. Synthese von 4,5-Dioxopyrazolin

Die benötigte Referenzsubstanz wurde auf drei verschiedenen Wegen dargestellt:

a) Nach KNORR u. PSCHORR (1896) über das 1-Phenyl-3-methyl-4-isonitrosopyrazolon-5, Reduktion mit Zinnchlorid zum Amin und oxidative Desaminierung zum Diketon. Reinigung über die Bisulfitverbindung, aus der es mit Säure wieder freigesetzt wird, oder aber direkte Weiterverarbeitung (s.u.).

b) Nach PREUSS u. VOIGT (1965) aus 1-Phenyl-3-methylpyrazolon-5 und p-Nitroso-N,N'-dimethylanilin und Verseifung des entstandenen Anils mit Schwefelsäure.

c) Der einfachste Syntheseweg führt über die hydrolytische Spaltung von Methylrubazonsäure mit Schwefelsäure zu 4,5-Dioxopyrazolin (EMERSON u. BEEGLE 1943).

Eine Reinigung der auf diesen Wegen gewonnenen Präparate wurde durch Sublimation unter vermindertem Druck (105°C, p kleiner als 10 Torr) vorgenommen. Daran anschließend war noch eine Umkristallisation aus Ligroin notwendig (KP 90-100°). Schmelzpunkt nach Umkristallisation 119-121,5°C.

2. Synthese von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin

Das Dihydroprodukt von 4,5-Dioxopyrazolin wurde nach KNORR u. PSCHORR (1896) durch Reduktion der Bisulfitverbindung von 4,5-Dioxopyrazolin mittels Natriumamalgam in verdünnter Essigsäure gewonnen. Umkristallisation aus heißem Wasser. Es bildeten sich weiße, zunächst noch glänzende, verfilzte Kristallnädelchen, die sich innerhalb von Wochen, an der freien Luft rascher, gelblich bis orangerot verfärbten. Schmelzpunkt unter Zersetzung 164-168°C.

3. Darstellung der Methylrubazonsäure

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von 4,5-Dioxopyrazolin benötigt, wurde Methylrubazonsäure durch Oxydation einer Lösung von 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon-5 und 4-Aminoantipyrin mit Kaliumhexacyanoferrat dargestellt (EMERSON u. BEEGLE 1943). Schmelzpunkt nach Umkristallisation aus Methanol 175-176°C.

C. QUALITATIVE UNTERSUCHUNGEN ZUR REAKTIVITÄT VON 4,5-DIOXOPYRAZOLIN UND 4-HYDROXY-5-OXOPYRAZOLIN

Der isolierte Metabolit 4,5-Dioxopyrazolin bzw. sein Dihydroprodukt 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin lassen bereits von ihrer Struktur her eine beträchtliche chemische Reaktivität erwarten.

4,5-Dioxopyrazolin läßt sich formal als ein heterocyclisches 4,5-Diketon, aber auch als ein heterocyclisches o-chinoides System auffassen, 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin in der Endiolform demnach als das entsprechende o-Hydrochinon.

Beide Substanzen bilden danach ein reversibles Redoxsystem, dem gewisse Redukton- bzw. Reduktonateigenschaften zukommen müßten.

Ferner ließ die Diketostruktur von 4,5-Dioxopyrazolin eine gesteigerte Reaktivität gegen Aminogruppen erwarten (PREUSS u. VOIGT 1965).

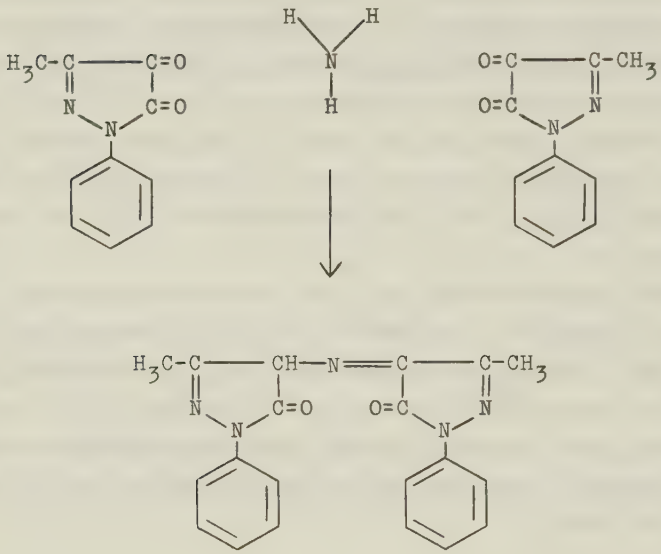
Unter diesen erwähnten Aspekten haben wir in qualitativen chemischen Untersuchungen orientierend die chemische Reaktivität der genannten Verbindungen geprüft.

1. Reaktionen von 4,5-Dioxopyrazolin mit Aminogruppen

a) Reaktion mit Ammoniak:

Wir beobachteten an 4,5-Dioxopyrazolin-Proben, die an der Luft gestanden hatten, Zersetzung u.a. zu Rubazonsäure. Diese konnte nur durch Dimerisierung von zwei Dioxopyrazolin-Molekülen unter Aufnahme von Ammoniak aus der Laborluft entstanden sein.

BILDUNG VON RUBAZONSÄURE DURCH DIMERISIERUNG
VON 4,5-DIOXOPYRAZOLIN MIT AMMONIAK



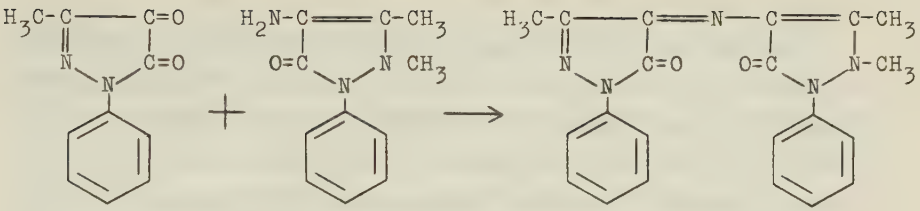
In systematischen Versuchen bestätigte sich diese Vermutung: in abgeschlossener Ammoniakatmosphäre wandelte sich 4,5-Dioxopyrazolin rasch quantitativ in Rubazonsäure um.

Wir bewahrten dementsprechend 4,5-Dioxopyrazolin über Phosphorpentoxid auf. Unter diesen Bedingungen erwies es sich als stabil.

b) Reaktion mit substituierten Aminen

Eine ähnliche Reaktivität wie gegen Ammoniak zeigt 4,5-Dioxopyrazolin auch gegen einige substituierte Amine.

So kondensiert 4,5-Dioxopyrazolin in wässerigem wie in nicht wässerigem Medium rasch mit 4-Aminoantipyrin zur Methylrubazonsäure. Diese Reaktion wurde bereits von EMERSON u. BEEGLE (1943) beschrieben. Wir haben die Reaktion zur Detektion von 4,5-Dioxopyrazolin in der Dünnschichtchromatographie benützt.

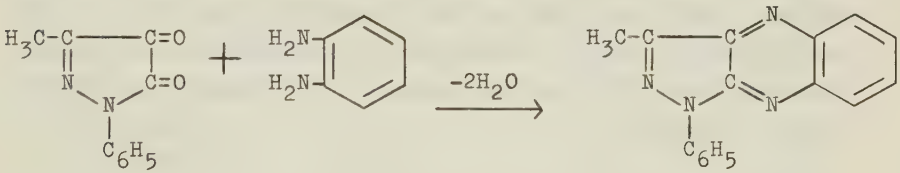


4,5-DIOXO-PYRAZOLIN

4-AMINO-ANTIPYRIN

METHYLRUBAZONSÄURE

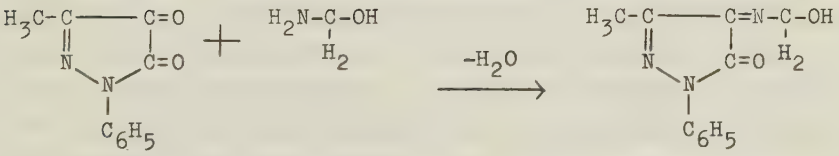
Die gleiche Reaktion liegt prinzipiell der Umsetzung mit o-Phenylendiamin zugrunde, die allerdings durch doppelte Reaktion mit dem 4,5-Diketon zu einem ringeschlossenen Benzopyrazin führt. Bemerkenswert ist hierbei die Reaktion auch der Carbonylgruppe an C_5, welche gegenüber der typischen Carbonylreaktion, nämlich der Oximbildung mit Hydroxylamin, auffälligerweise nicht so reagiert. 4,5-Dioxopyrazolin bildet lediglich ein Monoxim (PREUSS u. VOIGT 1965).



4,5-DIOXO-PYRAZOLIN

O-PHENYLEN-DIAMIN

BENZOPYRAZIN



4,5-DIOXO-PYRAZOLIN

HYDROXYL-AMIN

MONOXIM

c) Reaktion mit Aminosäuren

Nach den obigen Umsetzungen war auch eine Reaktion mit Aminosäuren zu gewärtigen. Andere heterocyclische Di- bzw. Polyoxoverbindungen wie Ninhydrin und Isatin zeigen bekanntermaßen eine solche Reaktivität (McCALDIN 1960, MAHLER-CORDES 1966). Wir haben daher 4,5-Dioxopyrazolin auf seine Eignung als Detektionsmittel für Aminosäuren z.B. in der Dünnschichtchromatographie geprüft. 4,5-Dioxopyrazolin gibt, in Pyridin/Isopropanol/Wasser/Zinkacetat gelöst und als Sprühreagenz verwendet, mit Aminosäuren gelbbraune bis braunviolette Farbflecke, die beim Erwärmen rasch hervortreten. Folgende Aminosäuren wurden dabei geprüft: Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Ser, Thre, Cys-SH, Cys-S-S-Cys, Meth, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, His. Interessanterweise gibt Prolin, das als einzige Aminosäure ein sekundäres N-Atom besitzt, keine Reaktion.

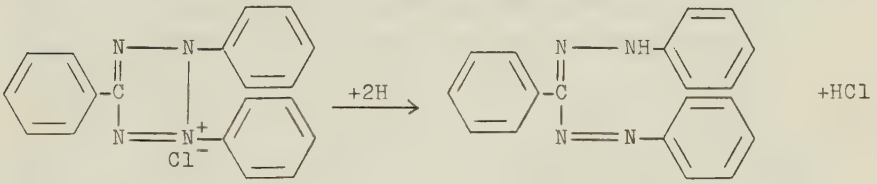
Auf dieser Reaktivität von 4,5-Dioxopyrazolin mit Aminosäuren, deren genauer Mechanismus noch unbekannt ist (Transaminierung oder Kondensation), dürfte auch seine Eigenschaft beruhen, an exponierten Hautstellen sich allmählich entwickelnde, ausgeprägte gelbrote beständige Pigmentierungen hervorzurufen. Diese sind durch organische Lösungsmittel nicht mehr zu entfernen und stellen damit eine substantielle Färbung der Haut (Gerbung) vermutlich durch Kondensation von 4,5-Dioxopyrazolin-Molekülen an das Hauteiweiß dar.

2. Reduktionsvermögen von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin

Bestimmte heterocyclische α-Ketole zeigen als sogenannte Reduktone ein charakteristisch ausgeprägtes Reduktionsvermögen (v. EULER u. EISTERT 1957). Eine derartige Molekülgruppierung tritt auch in dem wahrscheinlich gemachten Präkursor des 4,5-Dioxopyrazolins, dem 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-oxo-pyrazolin auf. Dies ließ ein den Reduktonen ähnliches Reaktionsvermögen dieser Substanz vermuten, zumal das N_2-Methyl-homologe α-Ketol, das 4-Hydroxyphenazon, bereits ein ausgeprägtes Reduktionsvermögen besitzt, z.B. gegen FOLINs-Reagenz.

Wir haben daher 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin mit einigen qualitativen Proben auf sein Reduktionsvermögen hin geprüft. Dabei verwendeten wir folgende Reaktionen:

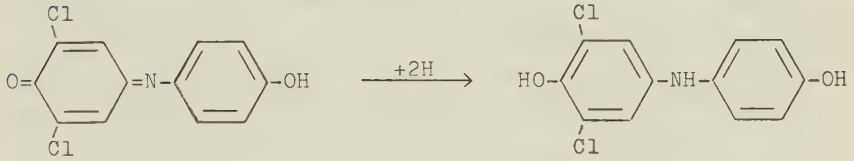
1) Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid (KUHN u. JERCHEL 1941, VEIBEL 1960).



TRIPHENYLTETRAZOLIUM-CHLORID (FARBLOS)

TRIPHENYLFORMAZAN (ROT)

2) Reaktion mit TILLMANS-Reagenz (2,6-Dichlorphenolindophenol).



DICHLORPHENOL-INDOPHENOL

LEUKOFORM

3) Reaktion mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz.

4) Reaktion mit Silbernitrat (sauer).

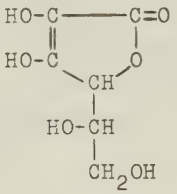
5) Reaktion mit Jodlösung (KJ/J_2).

Sämtliche Reaktionen fielen positiv aus. Hervorzuheben ist, daß 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin bereits in saurem Milieu die Reaktionen Nr. 2, 3, 4 gibt, es hier also als undissoziierte Verbindung reagiert. Dadurch erhält es den Charakter eines Reduktons gegenüber den Reduktonaten als Substanzen, die erst als Anionen, d.h. im alkalischen Milieu, reduzierende Eigenschaften besitzen.

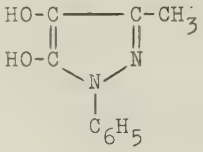
Bei allen genannten Reaktionen wurden jeweils Kontrollversuche mit Ascorbinsäure mitgeführt, die ein analoges Verhalten zeigten. Somit kann 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin bereits qualitativ mit der Ascorbinsäure, als dem wichtigsten und verbreitetsten natürlichen Redukton verglichen werden, was nach unserer Meinung besondere Beachtung verdient. Auch im Bezug auf die Ringspaltung nach Oxidation im alkalischen Milieu zeigen beide Substanzen eine prinzipielle Übereinstimmung (AUWERS 1911).

3. Prüfung von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin auf Endiolstruktur

Die Reaktivität von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin als Reduktionsmittel und damit dessen formale Ähnlichkeit mit dem biologischen Redukton Ascorbinsäure hat auch Bedeutung für die Festlegung der effektiven Molekülstruktur dieses heterocyclischen α-Ketols innerhalb der bereits eingangs diskutierten Tautomeren.



ASCORBINSÄURE



4,5-DIHYDROXY-PYRAZOLIN

Das ebenfalls heterocyclische Redukton Ascorbinsäure liegt in der Endiolform vor (HERBERT et al. 1933) und seine Reduktoneigenschaften beruhen gerade auf diesem Strukturelement. Durch Oxidation verliert diese labile Endiol-Form ihre beiden H-Atome an C_4 und C_5, die beide auf einen geeigneten Akzeptor (i.a. das Oxidationsmittel) übergehen. Bei dieser Dehydrogenierung bildet sich die Dehydro-Ascorbinsäure, also eine α-Diketoverbindung. Als Akzeptor, d.h. als Oxidationsmittel kann unter bestimmten Voraussetzungen gegenüber der Ascorbinsäure auch molekularer

Sauerstoff dienen. Dieser wird dabei zunächst zu H_2O_2 hydriert (HOLTZ u. TRIEM 1937, SCHALES 1938), welches zu Wasser und Sauerstoff zerfällt. Diese direkte Hydrierung des Sauerstoffs durch Ascorbinsäure tritt erst ein, wenn das Redoxpotential der Ascorbinsäure eine ausreichende Höhe erreicht, d.h. die Bindungsenergie der H-Atome einem Minimum zustrebt. Dies ist im alkalischen Milieu der Fall. Hier wird also die Ascorbinsäure, die in Substanz und in saurer Lösung relativ stabil gegen Oxydation ist, als Ascorbat-Anion (an C_4) autoxidabel (v. EULER u. EISTERT 1957).

Analog verhält sich auch 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin. Auf Grund seiner genannten Reaktionen ist es wahrscheinlich, daß mindestens ein Teil der Substanz in der Endiol-Form vorliegt oder aber in Lösung rasch in diese Form übergeht und aus dieser reagiert. Die hier vorgenommenen qualitativen Prüfungen liefern dafür keinen eindeutigen Beweis. Derartige Probleme können nur mit Hilfe moderner physiko-chemischer Methoden gelöst werden (z.B. NMR-Spektroskopie).

Unter dieser Einschränkung ist auch die von uns durchgeführte Probe auf eine Endiol-Gruppierung mit Titan-III-chlorid zu bewerten. Wir führten die Reaktion nach VEIBEL (1960) durch. Im Vergleich mit Ascorbinsäure als Kontrollansatz fiel die Reaktion mit 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin positiv aus: Bildung einer intensiv rotbraunen Färbung nach Zugabe des Titan-III-Salzes.

Nach diesem positiven Ausfall der weitgehend spezifischen Endiol-Reaktion ist das Vorliegen dieses Strukturelements bei der untersuchten Verbindung, zumindest als eine tautomere Form in Lösung, sehr wahrscheinlich gemacht. Die oben durchgeführten Reaktionen stehen damit ebenfalls in guter Übereinstimmung.

III. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Phenazon-Stoffwechsel

Vorbemerkung:

Auf Grund der bisherigen biochemischen Befunde über den Stoffwechsel des Phenazon konnte die Existenz eines neuen Metaboliten bei diesem Arzneimittel vorausgesagt werden. Durch C-Hydroxylierung an C_4 entsteht in vivo aus Phenazon 4-Hydroxyphenazon, durch N-Demethylierung an N_2 Norphenazon. Eine Kombination beider Reaktionen am gleichen Phenazonmolekül ergibt die Struktur von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin.

Diese Voraussage ließ sich beim Hund und beim Menschen durch den Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin nach Phenazongabe bestätigen. Hierbei wurde 4,5-Dioxopyrazolin vom Hund in freier Form im Harn eliminiert, beim Menschen jedoch nur in einer gebundenen Form. Diese maskierte Form von 4,5-Dioxopyrazolin im Humanharn ist polar und läßt sich mit unpolaren Lösungsmitteln nicht extrahieren. Die Bindung ist ferner gegen eine enzymatische Hydrolyse mit β-Glucuronidase sowie gegen eine milde Hydrolyse mit 1-10%iger Salzsäure beständig. Eine Bindung an Mucinkörper des Humanharnes konnte ausgeschlossen werden. Der Metabolit dürfte ferner kaum als Glucuronid oder Sulfat vorliegen, da in der durch Bleiacetatfällung isolierten Glucuronidfraktion der Metabolit nicht aufzufinden war. Erst durch energische Hydrolyse mit Schwefelsäure wird 4,5-Dioxopyrazolin aus seiner Bindung im Humanharn freigesetzt.

Im Gegensatz hierzu konnte bei Ratte und Kaninchen nach Phenazongabe im Harn kein 4,5-Dioxopyrazolin nachgewiesen werden. Offenbar liegt hier ein weiteres Beispiel qualitativer Speziesunterschiede im Stoffwechsel eines

Arzneimittels vor, wie sie bereits wiederholt beobachtet werden konnten (BRODIE u. MAICKEL 1961, WILLIAMS 1964, GILLETTE 1967, SMITH 1967, WILLIAMS 1967).

Die Ursachen für die hier beobachteten Unterschiede im Stoffwechsel von Phenazon bleiben zunächst offen. Folgende Möglichkeiten sind biochemisch zu diskutieren.

a) Elimination von freiem 4,5-Dioxopyrazolin im Hundeharn

Die große biochemische Reaktivität von 4,5-Dioxopyrazolin gegenüber Aminosäuren und Struktureiweißen (Haut) macht es unwahrscheinlich, daß diese Substanz als solche die Niere passiert. Es ist vielmehr anzunehmen, daß eine chemisch labile Transportform (z.B. ein Ester oder Äther des zugehörigen Endiols), die gut wasserlöslich ist, von der Leber, als dem Ort der Biotransformation, an das Blut abgegeben wird und als solche noch frei die Niere passieren kann. Durch spontane oder enzymatische Hydrolyse in den ableitenden Harnwegen wird das labile Endiol daraus frei, das sich sofort weiter zu 4,5-Dioxopyrazolin oxidiert. Damit erhält 4,5-Dioxopyrazolin den Charakter eines sekundären Metaboliten. Es reagiert im Harnmedium nicht bzw. nur noch zu einem Teil weiter mit anderen kopplungsfähigen Harninhaltsstoffen und bleibt so wenigstens teilweise direkt nachweisbar.

Daß Vorgänge, wie z.B. eine enzymatische Glucuronidspaltung, im Harn stattfinden können, wird durch unsere Beobachtung belegt, daß beim Hund nach Phenazongabe die ursprünglich mit Glucuronsäure gepaarten Metaboliten Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon im Harn zum größten Teil in freier Form vorliegen. Analoge Beobachtungen sind auch bei den Metaboliten anderer Arzneimittel gemacht worden (DUTTON 1966, WILLIAMS 1959).

b) Elimination einer maskierten Form von 4,5-Dioxopyrazolin beim Menschen

4,5-Dioxopyrazolin läßt sich im Humanharn nicht in freier Form nachweisen, der Metabolit wird hier in einer "konjugierten" gekoppelten Form eliminiert. Hier besteht grundsätzlich eine Alternative:

1. In Analogie zur oben skizzierten Vorstellung Freisetzung erst in den ableitenden Harnwegen aus einer nierengängigen Transportform und Umsetzung mit anderen normalen Harninhaltsstoffen, die offenbar nur im Humanharn vorkommen und eine relativ feste Bindung mit 4,5-Dioxopyrazolin eingehen können. UEHLEKE (1966) hat am Beispiel der N-Hydroxylierung des 4-Aminobiphenyls gezeigt, daß z.B. an der Blasenschleimhaut eine Aktivierung von Fremdstoffen möglich ist.

2. Addition von 4,5-Dioxopyrazolin bzw. seiner labilen Transportform zum endgültigen Konjugat bereits in der Blutbahn mit geeigneten Trägermolekülen und Nierenpassage bereits als fertiges Konjugat.

Für die Annahme, daß 4,5-Dioxopyrazolin als Artefakt bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure im Harn entsteht, z.B. aus der hier möglicherweise vorhandenen ringgeöffneten Form, der α-Keto-β-phenylhydrazinobuttersäure, die durch Säurebehandlung wieder in die isomere Ringform, das Dioxopyrazolin übergeht, haben wir keinen experimentellen Anhalt. Unter diesem Aspekt hätte sich im Harn bei normaler Extraktion z.B. mit Äther aus neutralem oder schwach saurem Milieu diese Substanz auffinden lassen müssen.

c) Fehlender Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin bei Ratte und Kaninchen

Bei Ratte und Kaninchen konnte nach Phenazongabe im Harn kein 4,5-Dioxopyrazolin nachgewiesen werden. Als Ursache ziehen wir hier in erster Linie die Labilität des Pyrazolin-dionringes in Betracht, der bereits oberhalb pH 6,5 unbeständig ist und sich in leicht alkalischen Medien unter Aufnahme von 1 Mol H_2O rasch zur entsprechenden α-Keto-β-phenylhydrazino-buttersäure aufspaltet (AUWERS 1911). In dieser Form ist der vordem stabile Pyrazolonring aber u.U. einem oxydativen Endabbau zu-

gänglich und entgeht damit dem Nachweis mit der verwendeten klassischen analytischen Methodik.

Dieser Vorstellung entsprechend würde 4,5-Dioxopyrazolin bei diesen Spezies zwar noch intermediär gebildet, durch aktive enzymatische oder passive Ringöffnung jedoch anschließend weiter abgebaut, so daß es im Harn nicht mehr in nachweisbaren Mengen erscheint. Eine exakte Prüfung dieses Problems wäre nur durch radiochemische Untersuchung mit C^{14}-kernmarkiertem Phenazon möglich.

Das bei der Utilisation des Buttersäurerestes anfallende aktive CO_2 ließe sich dann im Tierversuch in der Atemluft oder in weiteren markierten Harnbestandteilen nachweisen.

d) Transportform von 4,5-Dioxopyrazolin im Blut

Nach der Auffindung von 4,5-Dioxopyrazolin nach Phenazongabe im Harn von Hund und Mensch war auch im Blut entweder diese Verbindung selbst oder aber eine entsprechende Transportform zu erwarten. Wir konnten zwar nach Aufarbeitung von Vollblut, Erythrocyten und Plasma bzw. Serum die bisher bekannten Metaboliten Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon neben unverändertem Phenazon qualitativ erfassen; Hinweise auf 4,5-Dioxopyrazolin oder ein entsprechendes Derivat fanden sich jedoch nicht. Dies gilt für Hund und Mensch ebenso wie für Ratte und Kaninchen.

Wir untersuchten ferner nach hochdosierter Phenazongabe bei der Ratte auch das Leberhomogenat qualitativ auf 4,5-Dioxopyrazolin in der Vorstellung, hier eventuell eine größere Konzentration des Metaboliten vorzufinden als im Blut. Diese Experimente blieben jedoch erfolglos.

Die chemische Untersuchung von 4,5-Dioxopyrazolin hatte eine ausgeprägte Reaktionsfähigkeit dieses Metaboliten gegenüber Aminen, Aminosäuren und Eiweißkörpern ergeben. Hinzu treten ferner die Reduktionseigenschaften der Dihydroverbindung des 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin, die die Reaktionen eines naszierenden Chinons möglich machen (WANZLICK 1964). Auf Grund dieser besonderen Substanzeigenschaften und der relativ geringen Konzentrationen, die bei einem möglicherweise gut harngängigen Metaboliten im Blut aufgebaut werden können, war jedoch die Aussicht schon von vorn-

herein gering, mit klassischen Methoden diesen Metaboliten oder gar eine labile Transportform in einem proteinreichen biologischen Material, wie Blut oder Plasma, zu fassen. Das negative Ergebnis bei allen untersuchten Spezies dürfte demnach in erster Linie durch die Unempfindlichkeit der analytischen Methodik bedingt sein.

Bei Berücksichtigung der heutigen Kenntnisse des speziellen Arzneimittelstoffwechsels lassen sich jedoch bereits gewisse Vorstellungen über die chemische Struktur der im Blut befindlichen Transportform des im Harn aufgefundenen 4,5-Dioxopyrazolin gewinnen.

Die durch Biotransformation gebildete Stufe des 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin wird als heterocyclisches α-Ketol entweder in dieser Form oder nach Umlagerung zum entsprechenden Endiol entweder 1) verestert, 2) verätherт oder 3) anderweitig stabilisiert. Anhaltspunkte dafür, daß 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin bzw. seine Endiolform in freier Form in das Blut abgegeben wird, haben wir nicht. Das überaus starke Reduktionsvermögen dieser Substanz macht dies in hohem Grade unwahrscheinlich und legt die Vermutung nahe, daß es im Blut stets in einer durch Acylierung bzw. Alkylierung mäßig stabilisierten Form vorliegt. Diese kann jedoch leicht hydrolysiert werden unter Bildung des aktiven Endiols, welches zu 4,5-Dioxopyrazolin oxydiert wird.

1) Esterbildung: Für die Esterbildung an C_4 und C_5 kommen Sulfate (GREGORY 1962, GILLETTE 1963, BANERJEE u. ROY 1966) oder aber Phosphorsäureester in Betracht (HARRISON 1958, WIELAND u. PATTERMANN 1959). Letztere wären bei Berücksichtigung des Chinolcharakters überdies noch energiereich (WIELAND u. PATTERMANN 1959, TROLL et al. 1959, BOYLAND et al. 1961). Diese Ester anorganischer Säuren sind im allgemeinen sehr gut wasserlöslich und hochpolar. Ferner sind sie als Endiol-mono- bzw. diester gegen hydrolytische und oxydative Einflüsse gleichermaßen sehr labil. Sie wären demnach in der Lage, von der Dihydrostufe des Endiols (Chinols) durch Oxydation unter Abspaltung des Säurerestes 4,5-Dioxopyrazolin zu bilden unter Freisetzung chemischer Energie, die zu Folgereaktionen des 4,5-Dioxopyrazolins mit verschiedenen Akzeptoren dienen könnte (HARRISON 1958, CLARK et al. 1958).

Unter diesem Aspekt: Reaktivität eines naszierenden chinoiden Körpers aus einem Chinolester erscheint diese Reaktionsfolge auch biochemisch außerordentlich interessant. Gleichzeitig würde unter diesen Bedingungen das Versagen analytischer Methoden beim Nachweis im Blut sehr gut verständlich.

Wieweit für eine Esterbildung am 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin-Molekül auch organische Säuren in Frage kommen wie z.B. Acetatreste, muß offen bleiben. Hierüber liegen unseres Wissens für Endiole bzw. vicinale OH-Gruppen keine Beobachtungen vor.

2) Verätherung: Die Bildung von Methyläthern ist z.B. von den Dihydroxybenzolen der Katecholaminreihe als Metabolisierungsweg bekannt (AXELROD 1959, DE EDS et al. 1955). Ferner wurde beim Menschen der Methyläther des Oestrons (KRAYCHY u. GALLAGNER 1957) und der Xanthurensäure gefunden (PRICE u. DODGE 1956). Diese Stoffwechselreaktion würde bei vorliegendem 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin als Ausgangssubstanz zu einem 4-Methoxy-5-oxo-pyrazolin führen müssen bzw. zu dessen Enolform. Die als solche stabile Ätherbindung würde in diesem Falle durch die konjugierte Doppelbindung stark gelockert werden, so daß auch eine derartige En(di)oläther-Form als eine labile Transportform u.U. in Betracht zu ziehen ist.

3) Acetalisierung: Als letzte der bekannten Möglichkeiten zur Konjugation von Hydroxyverbindungen muß ferner an die Acetalisierung mit Glucuronsäure gedacht werden (GARTON u. WILLIAMS 1948, 1949). Auch diese Bindung dürfte bei 4,5-Dioxopyrazolin durch die benachbarte Ketogruppe bzw. Enolgruppierung sehr labil sein.

2. Stoffwechselverhalten der Derivate des 4-Aminoantipyrin

Mit dem Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonstoffwechsel bei Mensch und Hund war die Richtigkeit unserer Arbeitshypothese für dieses unsubstituierte Pyrazolon-5-Derivat bewiesen. Die Untersuchungen konnten jetzt auch auf die Reihe der Derivate des 4-Aminoantipyrin ausgedehnt

werden. Dabei wurden folgende Substanzen eingesetzt: Aminophenazon, 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin, Metamizol, Normetamizol und Isopropylaminoantipyrin.

Wesentliches Kennzeichen dieser Gruppe ist eine Aminofunktion an C_4, die teilweise oder vollkommen alkylsubstituiert ist; es handelt sich damit um sekundäre bzw. tertiäre Amine. Durch diese funktionelle Gruppe an C_4, die im Stoffwechsel durch N-Desalkylierung zum Teil wieder freigelegt wird, wird der Nachweis des gesuchten 4,5-Dioxopyrazolins jedoch erheblich erschwert. Das jeweils als Metabolit frei im Harn vorhandene 4-Aminoantipyrin bildet mit noch unbekannten Vorstufen im Harn ein typisches Pigment, die Methylrubazonsäure (PECHTOLD 1964, SCHÜPPEL u. SOEHRING 1965, VECERKOVA et al. 1967). Sie stellt ein unsymmetrisches Dimeres von 4-Aminoantipyrin mit einer N_2-demethylierten Pyrazolonstufe dar, die über eine Stickstoffbrücke zusammenhängen. Dieses Pigment bildet sich im Harn nach Körperpassage aller 4-Aminoantipyrin-Derivate langsam beim Stehen an der Luft, also aus geeigneten Vorstufen. Die eine davon dürfte 4-Aminoantipyrin selbst sein, während die zweite Komponente derzeit noch unbekannt ist. Einen weiteren homologen Farbstoff stellt die Rubazonsäure dar, die im Gegensatz zur Methylrubazonsäure eine symmetrische Struktur aufweist und sich aus zwei N_2-demethylierten Komponenten zusammensetzt. Sie wird ebenfalls als sekundärer Metabolit angesprochen, da sie sich im Harn beim Stehen an der Luft nachbildet.

Das Vorhandensein dieser beiden typischen Pigmente im Harn stört den Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin erheblich. Bei der von uns vorgenommenen Säurehydrolyse (mit 30 Vol% Schwefelsäure) erleiden die Methylrubazonsäure und in geringerem Maße auch die Rubazonsäure eine hydrolytische Spaltung zum jeweiligen Aminopyrazolon-Körper (entweder N_2-methyliert bei der Methylrubazonsäure oder N_2-demethyliert bei der Rubazonsäure) und zu 4,5-Dioxopyrazolin. Dadurch wäre bei unserem Vorgehen in jedem Falle Dioxopyrazolin bei den 4-Aminoantipyrinderivaten nachgewiesen worden, jedoch als Artefakt durch Hydrolyse der vorhandenen Pigmente und nicht als Beweis für das Vorkommen eines weiteren genuinen Metaboliten.

Um diese Störung zu umgehen, wurden die Harnproben vor der Hydrolyse durch erschöpfende Extraktion von Methylrubazonsäure und Rubazonsäure befreit, die Hydrolyse des Harnes dann sofort angeschlossen. Die vollständige Abtrennung der Pigmente wurde jeweils dünnschichtchromatographisch kontrolliert.

Mit diesem Vorgehen ließ sich 4,5-Dioxopyrazolin nunmehr auch bei allen geprüften Derivaten der 4-Aminoantipyrin-Reihe nachweisen. Über die Primärstruktur dieses Metaboliten konnte aber damit ebensowenig wie bei den Phenazonversuchen beim Menschen eine sichere Aussage gewonnen werden.

Durch Leerversuche mit synthetisch dargestelltem 1-Phenyl-3-methyl-4-amino-pyrazolon-5 (als $SnCl_2$-Salz) konnten wir ferner zeigen, daß 4,5-Dioxopyrazolin nicht durch die von uns benutzte Aufarbeitungsmethode aus dieser im Harn vermuteten Vorstufe entstehen kann. Diese in wässeriger Lösung oxydationsempfindliche Substanz wird durch die Säurehydrolyse nicht desaminiert. Das dürfte auf die Ionisierung der Aminogruppe durch die verwendete starke Säure zurückzuführen sein. Im Alkalischen desaminiert dieses heterocyclische Amin spontan und rasch unter Dimerisierung zur Rubazonsäure (KNORR 1887). Diese Reaktion wurde daher auch als Bildungsweise von Rubazonsäure im Harn nach Aminophenazongabe angesehen, was voraussetzt, daß 1-Phenyl-3-methyl-4-amino-pyrazolon-5 als primärer Metabolit im Harn erscheint. Dieser Beweis ist jedoch nie erbracht worden.

Nach Abtrennung der als Störfaktoren wirkenden Pigmente Rubazonsäure und Methylrubazonsäure liegt 4,5-Dioxopyrazolin wie im Stoffwechsel des Phenazon auch bei allen untersuchten Derivaten des 4-Aminoantipyrin in einer polaren, nicht extrahierbaren Form vor, in der es relativ fest gebunden ist.

Neben dieser fest gebundenen Form (stabiles "Compartment") von Dioxopyrazolin, aus der es erst durch energische Hydrolyse freigesetzt wird, muß in der Gruppe der 4-Aminoantipyrin-Derivate im Harn jedoch noch ein weiterer Primärmetabolit vorkommen. Dieser ist labil und kann sehr leicht in 4,5-Dioxopyrazolin übergehen (labiles "Compartment"), so daß er mit 4-Aminoantipyrin rasch Methylrubazonsäure, mit 1-Phenyl-3-methyl-4-

aminopyrazolon-5 rasch Rubazonsäure bildet. Wieweit dieser zu fordernde Metabolit mit 1-Phenyl-3-methyl-4-aminopyrazolon-5 identisch ist, bleibt zu diskutieren, ist aber augenblicklich nicht zu belegen. Wir haben uns damit nicht weiter beschäftigt und besprechen deshalb dieses Problem hier nur so weit, wie es für das Verständnis des experimentellen Vorgehens und der Ergebnisse erforderlich ist (Weiteres hierzu siehe bei VECERKOVA et al. 1967).

3. Diskussion einer gemeinsamen Wirkform

Für die biochemisch-pharmakologische Fragestellung ist der Befund wesentlich, daß bei Phenazon ebenso wie in der homologen Reihe der Derivate des 4-Aminoantipyrin 4,5-Dioxopyrazolin als ein uniformer Metabolit auftritt. Seiner chemischen Reaktivität entsprechend liegt er vorzugsweise in einer "konjugierten" Form vor. Wir führen diese "Konjugation" zunächst auf eine Folgereaktion von 4,5-Dioxopyrazolin bzw. seiner Dihydrostufe mit einem oder mehreren Akzeptormolekülen (Amine, Aminosäuren, Peptide usw.) zurück. Die genauere Kennzeichnung und der Nachweis der Bindungsform muß weiteren Untersuchungen mit radiochemischer Methodik vorbehalten bleiben.

Diese Befunde eines uniformen Metaboliten stützen die bereits einleitend näher ausgeführte Auffassung, daß hier auch eine einheitliche Wirkform vorliegen könnte. Diese entsteht durch Biotransformation aus mehreren formal-chemisch unterschiedlichen Gliedern einer homologen Reihe, indem die unterschiedlichen Seitenketten an N_2 und C_4 durch oxydative Umwandlung zum Teil ganz abgespalten werden und andererseits beim Phenazon durch Hydroxylierung die wichtige Hydroxyfunktion an C_4 neu eingeführt wird.

Bei den geprüften Derivaten eines einheitlichen Grundgerüstes, die alle ein praktisch identisches Wirkungsspektrum besitzen, könnte damit eine einheitliche Wirkform für die pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen verantwortlich gemacht werden.

Dies hat umso mehr Berechtigung, als 4,5-Dioxopyrazolin durch seine besondere chemische Reaktionsweise bereits eine Grundlage zum Verständnis seiner möglichen Wirkungen bietet. Dabei hat vor allem die hohe Affinität von 4,5-Dioxopyrazolin gegenüber Aminogruppen Interesse. Die Reaktionsfähigkeit mit Aminosäuren ließ sich durch entsprechende Farbreaktionen in der Dünnschichtchromatographie nachweisen. Offensichtlich verläuft diese Reaktion analog zu der Umsetzung von Aminosäuren mit Ninhydrin und Isatin, bei welchen oxydative Transaminierung und Bildung dimerer Produkte über Stickstoffbrücken diskutiert wird (MAHLER-CORDES 1966).

Ähnliches gilt für den Chemismus der Murexidreaktion (KLAGES 1958). Bei 4,5-Dioxopyrazolin führt die analoge Dimerisierungsreaktion zur Bildung von Rubazonsäure.

Eine weitere bedeutsame Beobachtung ist die Avidität von 4,5-Dioxopyrazolin gegenüber der Haut; es führt zu dauerhafter Pigmentierung und zu Gerbeffekten an der Haut. Darin sehen wir ein generelles Reaktionsvermögen dieser Substanz gegenüber Gewebeeiweiß. In diesem Zusammenhang ist 4,5-Dioxopyrazolin als mögliches Hapten für die Pyrazolon-Allergie von Interesse (MAYER 1958). Damit gewinnt ein durch Biotransformation aktivierter gemeinsamer Metabolit auch für toxikologische Effekte Bedeutung. Diese Auffassung bietet Ansatzpunkte zum Verständnis von Kreuzallergien innerhalb dieser Arzneimittelgruppe. Über Kreuzallergisierung mit wechselhafter Spezifität in dieser Arzneimittelgruppe wurde von KERP u. KASEMIR (1964) und THIERFELDER et al. (1964) berichtet.

Über die möglichen Mechanismen pharmakologischer Wirkungen lassen sich derzeit noch keine Aussagen machen. Doch bietet das vorgeschlagene Konzept einer einheitlichen Wirkform, die nachprüfbare chemische Reaktivität besitzt, möglicherweise eine neue Basis für weitergehende Studien über die Wirkungsmechanismen dieser Arzneimittelklasse. Hier sei abschließend lediglich auf die Möglichkeit der Beeinflussung von biogenen Aminen, Polypeptiden, Kininen und besonders des endogenen Pyrogens hingewiesen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von theoretischen Überlegungen über bisher bekannte Stoffwechselreaktionen im Metabolismus von Phenazon und verschiedenen Derivaten der Aminophenazonreihe wird als ein neuer Metabolit 4,5-Dioxopyrazolin gefordert, der bei allen untersuchten Arzneimitteln gemeinsam vorkommen sollte.

A. BIOCHEMISCHE VERSUCHE

Am Modell des Phenazons gelang es beim Hund, diesen Metaboliten in freier Form im Harn nachzuweisen. Beim Menschen tritt er in einer polaren gebundenen Form auf, aus der er erst durch energische Hydrolyse freigesetzt werden kann. Der Metabolit wurde aus Humanharn isoliert und im Vergleich mit synthetisch gewonnener Substanz als 4,5-Dioxopyrazolin identifiziert.

Bei Ratte und Kaninchen gelang der Nachweis im Harn nach Phenazongabe nicht. Als Ursache für diese auffälligen Speziesunterschiede im Stoffwechsel von Phenazon nehmen wir Ringspaltung von 4,5-Dioxopyrazolin und oxydativen Endabbau der entstandenen α-Keto-β-Phenylhydrazinobuttersäure an.

Im Blut von Mensch, Hund, Ratte und Kaninchen kann mit klassisch-analytischer Methodik weder 4,5-Dioxopyrazolin noch eine entsprechende labile Transportform aufgefunden werden. Im Leberhomogenat der Ratte nach Phenazongabe war die Suche ebenfalls ergebnislos.

Die Ursachen für die negativen Ergebnisse dürften 1. in der mangelnden Empfindlichkeit der Nachweismethode und 2. in der starken Bindungsfähigkeit an die Proteine des betreffenden biologischen Materials liegen. Beides kann nur mit Verwendung radiochemischer Methodik umgangen werden.

Bei Versuchen mit stimulierten Rattenlebermikrosomen zur Biotransformation von Phenazon in vitro ließen sich qualitativ zwar Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon nachweisen, 4,5-Dioxopyrazolin fanden wir jedoch nicht. Als Ursache kommen ebenfalls unzureichende Empfindlichkeit der Methodik bei ausgeprägter Eiweißbindung des Metaboliten sowie dessen starke Alkalilabilität schon im Bereich physiologischer Puffersysteme in Betracht.

Von diesen Ergebnissen ausgehend konnte in der Reihe der 4-Aminoantipyrin-Derivate nach entsprechender modifizierter Aufarbeitung der Humanharne ebenfalls 4,5-Dioxopyrazolin in einer analog gebundenen Form nachgewiesen werden. Hierbei wurden folgende Pharmaka geprüft: Aminophenazon, Amizol, Metamizol, Isopropylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin und 4-Acetylaminoantipyrin.

Bei Isopropylantipyrin waren die Ergebnisse nicht ganz sicher reproduzierbar. Wiederholung der Versuche am Menschen wurde durch die schlechte Verträglichkeit dieses Arzneimittels behindert.

B. CHEMISCHE VERSUCHE

Zur weiteren Kennzeichnung des aufgefundenen Metaboliten, der bereits von der chemischen Struktur her eine beträchtliche Reaktivität erwarten ließ, wurden einige orientierende Versuche durchgeführt.

4,5-Dioxopyrazolin wurde dabei auf seine Reaktivität gegen Aminogruppen untersucht:
Mit Ammoniak in der Gasphase wird unter Dimerisierung Rubazonsäure gebildet; mit 4-Aminoantipyrin entsteht Methylrubazonsäure. Mit Aminosäuren

gibt das Diketon unspezifische Farbreaktionen. An Hautgewebe führt die Substanz zu dauerhafter braunroter Pigmentierung. Ferner gibt sie die typischen Reaktionen mit o-Phenylendiamin und Hydroxylamin.

Die reduzierte Form des Metaboliten, 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin, wurde auf ihre Reduktionseigenschaften und auf ihren Enolisierungsgrad hin überprüft:
Sie reduziert Triphenyltetrazoliumchlorid (Rotfärbung bereits in der Kälte) und Dichlorphenolindophenol (sofortige Entfärbung aus saurem Milieu) sowie FOLINS-Reagenz, Silbernitrat- und Jodlösung. Die Farbreaktion auf Endiole mit Titantrichlorid fällt im Vergleich mit Ascorbinsäure positiv aus.

Damit ist für den neuen Metaboliten bzw. seinen Redoxpartner eine Reihe von Umsetzungen nachgewiesen worden, die diese Substanz auch unter biochemischem Aspekt interessant erscheinen läßt. Dies gilt besonders für seine mögliche Funktion als universelle, gemeinsame Wirkform der untersuchten Gruppe von arzneilich benützten Pyrazolonkörpern.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeines:

Alle Harn- und Blutproben wurden 2-4mal mit 1/2 Vol. Chloroform oder Benzol extrahiert (gegebenenfalls Probe auf Vollständigkeit der Extraktion). Die vereinigten Extrakte wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Es wurden Plattenformate von 5x20, 10x20 und 20x20 cm benutzt. Als Sorptionsmittel dienten Kieselgel GF_{254} (Merck) und Cellulosepulver MN $300F_{254}$. Die Beschichtung der Platten erfolgte nach STAHL (1968).

Als Fließmittel wurden benutzt:

für Kieselgelplatten:	Nr. 1	Chloroform : Äthanol	100 : 3
	Nr. 2	Chloroform : Äthanol	100 : 10
	Nr. 3	Heptan : Chloroform : Äthanol	100 : 50 : 7,5
	Nr. 4	Heptan : Chloroform : Äthanol	75 : 75 : 7,5
	Nr. 5	Heptan : Chloroform : Äthanol	75 : 75 : 15
für Celluloseplatten:	Nr. 6	Methanol : Wasser	40 : 60

Für die schwierige Trennung der eng verwandten Substanzen Antipyrin, 4-Hydroxyantipyrin, Norphenazon und 4,5-Dioxopyrazolin erwiesen sich die Fließmittel Nr. 3 u. 5 als am besten geeignet, sofern die aufgetragene Substanzmenge klein gehalten wurde. Die Metaboliten des Aminophenazon trennten sich gut mit Fließmittel Nr. 2.

Die Detektion der Metaboliten auf den Dünnschichtplatten erfolgte durch Vergleich mit den im gleichen Trennvorgang mitlaufenden Referenzsubstanzen. Bei ungefärbten Metaboliten wurde die Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254nm benutzt. Außerdem standen für die einzelnen Substanzen folgende Sprühreagentien für Farbreaktionen zur Verfügung:

Für Dioxopyrazolin:

1.) 2%ige wäßrige Lösung von 4-Aminoantipyrin mit 1-2 Tr. n-HCl leicht angesäuert: Rotfärbung durch Methylrubazonsäure-Bildung.

2.) a) 1%ige Lösung von o-Phenylendiamin in halbkonzentrierter Essigsäure: Gelbfärbung

b) anschließendes Besprühen mit konzentrierter Schwefelsäure: Blauviolettfärbung.

Für Norphenazon:

1.) a) 1%ige 4-Aminoantipyrinlösung

b) 2%ige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat mit 2% Ammoniak

Die Chromatogramme werden erst mit a) dann mit b) besprüht: Rotfärbung durch Methylrubazonsäure-Bildung.

2.) Ehrlich's Reagenz (2%ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in rauchender Salzsäure): gelborange Farbe nach Erhitzen.

Für 4-Hydroxyphenazon:

Folins-Reagenz, 1:5 mit Wasser verdünnt: rasche Blaufärbung.

Für Phenazon:

1.) Ehrlich's Reagenz (s.o.): Gelbfärbung nach Erhitzen.

2.) Salpetrige Säure (0,5% Na-Nitrit + 2gtt. HCl): Grünfärbung.

3.) Eisen-III-chlorid, 1%ige wäßrige Lösung: karminrote Farbe.

Für 4-Aminoantipyrin:

1.) Eisen-III-chlorid, 1%ige wässerige Lösung: rotviolette bis purpurrote Farbe.

2.) Ehrlich's Reagenz (s.o.): Gelbfärbung.

3.) a) 1%ige wässerige Norphenazonlösung

b) 2%ige wässerige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat mit 2% Ammoniak.

Erst mit a) dann mit b) besprühen: Rotfärbung durch Methylrubazonsäure.

Für 4-Monomethylaminoantipyrin:

1.) Reagenz auf sekundäre Amine nach FEIGL-ANGER:
   a) 1%ige wässerige Lösung von Nitroprussidnatrium mit 10% Acetaldehyd.
   b) 2%ige wässerige Sodalösung
   zu gleichen Teilen gemischt: hellblaue Farbe, die nach wenigen Minuten verblaßt.
2.) Eisen-III-chloridlösung (1%ig): Rotfärbung.
3.) Silbernitrat, 0,1%ige wässerige Lösung, mit Zusatz von verdünntem Ammoniak, bis sich der Niederschlag eben wieder vollständig auflöst: rasche Schwarzfärbung schon in der Kälte.

Für Rubazonsäure:

1.) Vorübergehende Rotfärbung durch Begasung mit Ammoniak.
2.) 1%ige 4-Aminoantipyrinlösung: allmähliche Rotfärbung durch Methylrubazonsäure-Bildung.

1. 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonharn des Hundes

Ein weiblicher Hund (23 kg) erhielt mittels eines Magenschlauches 2 g Phenazon in 100 ml Wasser. Nach 24 h wurden 200 ml Katheterharn (pH 5,5) gewonnen.

Extraktion des Harnes mit 2x100 ml Chloroform (Extrakt 1). Anschließend wurde der Harn mit 3 ml 25%iger HCl angesäuert und für 20 min. gekocht. Nach Abkühlen erneute Extraktion mit 2x100 ml Chloroform (Extrakt 2).

Nach Entwicklung in den Fließmitteln Nr. 3 u. 5 wurden im Extrakt 1 neben einigen nativen Farbstoffen Phenazon, Norphenazon, 4-Hydroxyphenazon und 4,5-Dioxopyrazolin nachgewiesen. Der Extrakt 2 enthielt Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon.

2. Versuche zum Nachweis von Dioxopyrazolin im Phenazonharn des Menschen

Für die folgenden Versuche wurden die Sammelurine von 2 gesunden männlichen Probanden verwendet, die täglich 3x 0,7 g Phenazon einnahmen.

a) Aufarbeitung wie beim Hundeharn

Extraktion von 100 ml Harn mit Chloroform (Extrakt 1).
Extraktion von 100 ml Harn mit Chloroform nach 24stündiger kalter Hydrolyse mit 2 ml 25%iger Salzsäure (Extrakt 2).
Extraktion von 100 ml Harn mit Chloroform nach 20minütigem Kochen mit 2 ml 25%iger Salzsäure (Extrakt 3).

Extrakt 1 enthielt nur Phenazon, die Extrakte 2 u. 3 Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon.

b) Inkubation mit Glucuronidase (BERGMEYER 1962)

Inkubationsansätze: je 100 ml frisch ausgekochter Phenazon- und Leerharn.
+ je 400 ml Acetatpuffer (pH 4,62)
+ je 1 ml β-Glucuronidase (≙ 100 000 E) (Boehringer/ Mannheim)

Inkubation bei 37°C für 48 h.
Extraktion der Ansätze mit Benzol; der Extrakt des Phenazonharns enthielt Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon.

c) Bleiacetatfällung der Glucuronide (KAMIL-SMITH-WILLIAMS 1952)

1 l Phenazonharn (sowie eine entsprechende Menge Leerharn) wurden mit Eisessig jeweils auf pH 4 angesäuert. Dann wurde neutrales Bleiacetat (50 g/150 ml H_2O) bis zur Vollständigkeit der Fällung zugesetzt (ca. 90 ml) und der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniak auf pH 8 alkalisiert. Erneute Fällung durch Zusatz von ca. 1 l gesättigtem basischem Bleiacetat (20 g/1 l H_2O). Die Fällung wird nicht ganz vollständig, da schon ammoniakalisches Wasser mit basischem

Bleiacetat eine Trübung ergibt. Nach Zentrifugierung wurde der Überstand verworfen, das Sediment dreimal mit H_2O gewaschen und schließlich in 200 ml H_2O fein suspendiert. Unter häufigem Umrühren wurde für 2 h H_2S eingeleitet. Nach vollständiger Fällung des PbS (geprüft mit H_2S-Wasser) wurde der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuumrotationsverdampfer bei 45°C bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Anschließend Gefriertrocknung.

Je eine Spatelspitze der Glucuronidfraktion wurde in H_2O gelöst und mit steigenden Konzentrationen von Salz- und Schwefelsäure heiß hydrolysiert. Der Chloroformextrakt der Hydrolyseansätze enthielt Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon, aber kein 4,5-Dioxopyrazolin.

d) Hydrolyse von Phenazonharn mit Schwefelsäure

Je 100 ml Phenazonharn wurden mit 5, 10, 20, 50 u. 80 ml konzentrierter Schwefelsäure für 20 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Ansätze ohne vorherige Neutralisation mit Benzol extrahiert. Dabei ließ sich vor allem im Extrakt des mit 50 ml Schwefelsäure (30 Vol% Endkonzentration) gekochten Harnes auf der Dünnschichtplatte (Fließmittel Nr. 3) eindeutig 4,5-Dioxopyrazolin nachweisen. Aus den mit 10 und 20 ml Schwefelsäure gekochten Harnen konnte ebenfalls 4,5-Dioxopyrazolin extrahiert werden, jedoch in wesentlich geringeren Mengen.

e) Mucinfällung des Phenazonharnes mit Alkohol (RIMINGTON 1940)

Aus 100 ml Phenazonharn wurden mit ca. 50 ml absolutem Alkohol die im Harn befindlichen Mucoproteide ausgefällt, abzentrifugiert, zweimal mit 10 ml H_2O gewaschen und mit 20 ml 30 Vol%iger Schwefelsäure auf dem Wasserbad erhitzt. Im Benzolextrakt des Hydrolysates fanden sich keine Metaboliten des Phenazons.

3. Isolierung von 4,5-Dioxopyrazolin aus Phenazonharn

6 Liter Harn von 2 gesunden Versuchspersonen, die täglich 3x 0,75 g Phenazon einnahmen, wurden mit 3 Litern konzentrierter Schwefelsäure hydrolysiert (20 min); nach Abkühlen Extraktion mit 3x 2 Litern Benzol. Für eine ausreichende säulenchromatographische Auftrennung des Benzolextrakts konnte keine geeignete Methode gefunden werden. Der eingeengte Benzolextrakt wurde deshalb zunächst auf Celluloseplatten aufgetragen und diese in Fließmittel Nr. 6 entwickelt. Die das 4,5-Dioxopyrazolin enthaltende Frontschicht wurde sofort abgekratzt und mit Benzol eluiert. Eine weitere Reinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Fließmittel Nr. 5). Elution mit Äther und Trocknung des Eluats über Phosphorpentoxid im Exsikkator. Anschließend Sublimation bei 105°C und 10 mm Hg. Die sublimierte Substanz wurde erneut auf Kieselgelplatten in Fließmittel Nr. 1 chromatographiert, mit wasserfreiem Äther eluiert und nach Abdunsten des Äthers mit Ligroin umkristallisiert. Dabei kristallisierten ca. 3 mg 4,5-Dioxopyrazolin als rote Nadeln aus.

Schmelzpunktsbestimmung im SP-Mikroskop: 118-121°C

Mischschmelzpunkt (Verhältnis 1:1): 118-120°C

Schmelzpunkt von synthetischem 4,5-Dioxopyrazolin: 119,5-121°C.

UV-Spektrum: Lösung von 4,5-Dioxopyrazolin in Aqua dest. (pH 5,5), Konzentration 4 mcg/ml, zeigt Maximum bei 232 nm (registriertes Zeiss-Gerät).

IR-Spektrum: KBr-Preßling, Laufzeit 15 min, Leitz-IR-Spektrometer mit Mikroeinrichtung.

4. Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Phenazonharn von Ratte und Kaninchen

6 Ratten (ca. 240 g) erhielten jeweils 20 mg/kg Phenazon in 10 ml Wasser mit der Magensonde. Nach 12 h wurden ca. 45 ml Harn gesammelt.

Außerdem wurde einem Kaninchen (2,8 kg) 40 mg/kg Phenazon in 25 ml Wasser eingegeben. Harnmenge nach 12 h 33 ml.

Die Harne wurden jeweils in 3 Stufen aufgearbeitet:

a) Extraktion mit Chloroform (Extrakt 1)

b) Hydrolyse mit 1%iger Salzsäure und Extraktion mit Chloroform (Extrakt 2)

c) Hydrolyse mit Schwefelsäure (30 Vol%) und Extraktion mit Benzol (Extrakt 3).

Ergebnis: Extrakt 1 enthielt Phenazon, Extrakt 2 Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon. 4,5-Dioxopyrazolin konnte nicht nachgewiesen werden.

5. Suche nach 4,5-Dioxopyrazolin im Blut von Mensch, Hund und Ratte sowie im Rattenleberganzhomogenat

a) Blutgewinnung beim Menschen: Eine männliche Versuchsperson nahm im Abstand von 2 h 2x1,25 g Phenazon ein. 2 h nach der letzten Phenazonapplikation wurden 80 ml Venenblut entnommen, mit Heparin (2,5 ml Liquemin/Roche) ungerinnbar gemacht und zentrifugiert.

b) beim Hund: 4 h nach Applikation von 80 mg/kg Phenazon wurden einem weiblichen Hund (23 kg) 40 ml Blut in Heparin entnommen und zentrifugiert.

c) bei der Ratte: 4 h nach Applikation von 20 mg/kg Phenazon wurde bei sechs mit Äther narkotisierten Ratten (320-350 g) durch Herzpunktion je ca. 6 ml Blut entnommen, heparinisiert und zentrifugiert.

d) Außerdem wurden von diesen Tieren insgesamt 50 g Leber entnommen und in 300 ml Phosphatpuffer pH 6,0 homogenisiert.

Plasma und Blutkuchen der einzelnen Spezies sowie das Leberhomogenat wurden getrennt nach folgendem Schema aufgearbeitet:

a) Extraktion mit Chloroform (Extrakt 1).
b) Hydrolyse mit 1%iger Salzsäure und Extraktion mit Benzol (Extrakt 2).
c) Hydrolyse mit Schwefelsäure (30 Vol%) und Extraktion mit Benzol (Extrakt 3).

Dabei fand sich in Extrakt 1 jeweils Phenazon, in Extrakt 2 nach Salzsäurehydrolyse Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon, während 4,5-Dioxopyrazolin in keinem der Extrakte nachgewiesen werden konnte.

6. Versuche mit Rattenlebermikrosomen

a) Mikrosomenpräparation:

4 Ratten (ca. 200-250 g) wurden über drei Tage mit täglich 80 mg Luminal/kg i.p. stimuliert. Die von den nach 3 Tagen getöteten Tieren gewonnene Leber (19,6 g) wurde in 125 ml Saccharose-Titriplex (0,25 m Sacch.; 1 mM Titriplex) homogenisiert und in der Kühlzentrifuge folgendermaßen zentrifugiert:

10 min bei 800-1000 Umdrehungen; der Überstand davon
10 min bei 7000 Umdrehungen; der Überstand erneut
10 min bei 11000 Umdrehungen. Anschließend wurde der Überstand 1 h bei 40000 Umdrehungen in der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die sedimentierten Mikrosomen in KCl-Tris-Puffer (Trispuffer pH 7,5; KCl 1,15%) aufgeschwemmt, und die Suspension nochmals 1 h bei 40000 Umdrehungen zentrifugiert. Überstand abgießen und Mikrosomen mit 39,2 ml KCl-Tris-Puffer aufschwemmen (1 g Leber $\hat{=}$ 2 ml Suspension).

b) Inkubation

Für Phenazon, Norphenazon und 4-Hydroxyphenazon als eingesetzte Substanzen wurde je ein Ansatz zu 40 ml inkubiert.

Tris pH 7,5	0,25 M	8 ml	
$MgCl_2$ in Tris	50 mM	4 ml	
Isocitrat-Na	80 mM	4 ml	
TPN-Na	10 mM	4 ml	
Mikrosomensuspension		12 ml	(1 ml ≙ 0,5 g Leber)
Isocitratdehydrogenase (Boehringer/Mannheim)		0,1 ml	
Phenazon (Norphenazon, 4-Hydroxyphenazon)	$5x10^{-3}$M	8 ml	

im Phenazonansatz zusätzlich 4 mg UDP-Glucuronsäure (Boehringer/Mannheim)

Inkubationszeit: 1 h bei 37°C.

Einwaage:

$MgCl_2 \times 6 H_2O$ in Tris	254,1 mg/25 ml
TPN-Na	114,8 mg/15 ml
Isocitrat-Na	309,6 mg/15 ml
Phenazon	23,5 mg/25 ml
Norphenazon	21,75 mg/25 ml
4-Hydroxyphenazon	25,5 mg/25 ml
Tris-Puffer	15,125 g Tris/125 ml H_2O
	101,5 ml n-HCl
	ad 500,0 ml H_2O

c) Aufarbeitung

Extraktion der Ansätze mit Chloroform (Extrakt 1).
Extraktion mit Chloroform nach Kochen mit Salzsäure (5%) für 30 min (Extrakt 2).
Extraktion mit Benzol nach Kochen mit Schwefelsäure (30 Vol%) für 30 min (Extrakt 3).

Im Extrakt 1 des Phenazonansatzes fanden sich dünnschichtchromatographisch Norphenazon und eine Spur 4-Hydroxyphenazon. Im Norphenazon- und 4-Hydroxyphenazonansatz fanden sich nur die eingesetzten Substrate.

d) Proteinbestimmung

0,2 ml	Mikrosomensuspension
+ 1,2 ml	Desoxycholat-Na (10%ig in H_2O)
15 min	warten bis zum Aufklaren der Lösung
+ 0,6 ml	NaOH (0,2%)
+ 4,0 ml	Biuret-Reagenz
+ 4,0 ml	Harnstoff-Thymol-Reagenz
30 min	im Wasserbad bei 40°C inkubieren.

Messung gegen Leerwert bei 555 nm (Bausch & Lomb Photometer)
Leerwert: 0,2 ml Puffer/KCl = 1 : 4 statt Mikrosomensuspension

Ergebnis:

	Ref.	E_{555}	Protein (mg/ml)
Leerwert	H_2O	0,070	---
0,1 ml Mikrosomen-Susp.	RLW	0,026	8,4
0,2 ml Mikrosomen-Susp.	RLW	0,048	7,8
			8,1

Umrechnungsfaktor: $163 \times E_{555} \triangleq$ mg Protein/ml Suspension
Standard: Proteinstandardlösung Labtrol DADE Reagents Inc. Miami (Fla.)

Biuret-Reagenz:
Kalium-Natrium-Tartrat 9,0 g
0,2 n-NaOH (carbonatfrei) 400,0 ml
lösen und unter Rühren zugeben
Kupfer-II-Sulfat (gepulvert) 3,0 g
nach dem Lösen zugeben
Kaliumjodid 5,0 g
0,2 n NaOH ad 1000,0 ml

Harnstoff-Thymol-Reagenz:

Harnstoff	300,0 g
erbsgroße Menge Thymol	
Aqua dest.	700,0

erhitzen, bei trüber Lösung 3 g Aktivkohle zugeben, gründlich schütteln und klar filtrieren.

Aqua dest.	ad 1000,0

7. Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Humanharn nach Einnahme verschiedener Aminophenazon-Derivate

Je 2 Versuchspersonen erhielten oral 1-1,5 g folgender Verbindungen: Pyramidon, Novalgin, Melubrin, Isopyrin, 4-Aminoantipyrin und 4-Acetylaminoantipyrin (die letzte Substanz wurde höher dosiert: 2,0-2,2 g). Je 100 ml der 12 h-Sammelurine wurden durch mehrfaches Ausschütteln mit Chloroform vollständig von Rubazonsäure und Methylrubazonsäure befreit (Extrakt 1). Die Prüfung auf Vollständigkeit der Extraktion mußte wegen der Nachbildung von Methylrubazonsäure im Chloroformextrakt rasch durchgeführt werden. Die extrahierten Harne wurden anschließend sofort mit Schwefelsäure (30 Vol%) 20 min lang auf dem Wasserbad erhitzt (95°C) und nach dem Abkühlen mit Benzol extrahiert (Extrakt 2). Dabei kann 4-Aminoantipyrin auf Grund der Salzbildung im sauren Milieu nicht ins Extraktionsmittel übergehen, so daß eine Nachbildung der Methylrubazonsäure ausgeschlossen ist.

Bei allen genannten Substanzen ließ sich im Extrakt 2 auf der Dünnschichtplatte 4,5-Dioxopyrazolin nachweisen. Durch Schwefelsäurehydrolyse von Leerharnen mit den zugesetzten Metaboliten 4-Aminoantipyrin, 4-Aminopyrazolon-5, und 4-Hydroxyphenazon bildete sich kein 4,5-Dioxopyrazolin.

Die Chloroformextrakte 1 wurden dünnschichtchromatographisch mit den Fließmitteln 1 u. 2 auf die schon bekannten Metaboliten Monomethyl-

aminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin, Rubazonsäure und Methylrubazonsäure untersucht. Nach milder Salzsäurehydrolyse der Harne wurden die Chloroformextrakte auch auf ihren Gehalt an 4-Hydroxyantipyrin geprüft. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte durch die entsprechenden Vergleichssubstanzen und mittels der eingangs aufgeführten Sprühreagentien.

8. Nachweis von 4,5-Dioxopyrazolin im Isopropylantipyrin-Harn

Einnahme der schlecht wasserlöslichen Substanz in Gelatinekapseln; das Präparat verursacht in höherer Dosierung eine starke Reizung der Magenschleimhaut mit Brechreiz. Versuche mit Hunden schlugen deshalb fehl.

Nach Verabreichung von 2,0 g Isopropylantipyrin an eine gesunde männliche Versuchsperson wurden 100 ml des 12 h-Sammelurins in 30%iger Schwefelsäure hydrolysiert. Ein- und zweidimensionale Auftrennung des Benzolextrakts in den Fließmitteln 3 u. 5 führte zweimal zum dünnschichtchromatographischen Auffinden von Dioxopyrazolin. Bei geringerer Dosierung war dieser Befund nicht immer deutlich reproduzierbar.

Chemische Versuche

1. Synthesen von Dioxopyrazolin

a) aus Isonitrosopyrazolon (nach KNORR & PSCHORR 1896)

12 g 1-Phenyl-3-methyl-4-isonitrosopyrazolon-5 wurden mit 40 g Zinn-II-chlorid und 300 ml 25%iger Salzsäure unter Erwärmen bis zur Entfärbung reduziert. Nach Abkühlen rasches Eingießen des entstandenen Amins in eine Lösung von 80 g Eisen-III-chlorid in 400 ml Wasser. Filtra-

tion der ausgefallenen Rubazonsäure und Extraktion des Filtrats mit Äther. Die eingeeengte Ätherphase wurde mit konzentrierter Natriumbisulfitlösung versetzt und über Nacht stehengelassen. Das gebildete Bisulfitaddukt wurde abgenutscht, mit Bisulfitlösung und zweimal mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 9,1 g Dioxopyrazolin-Bisulfit. Spaltung der Bisulfitverbindung mit 20%iger Schwefelsäure und Extraktion des Diketons mit Benzol.

In einem entsprechenden Versuch wurde zur Gewinnung von 1-Phenyl-3-methyl-4-amino-pyrazolon-5 das 1-Phenyl-3-methyl-4-isonitrosopyrazolin-5 wie oben reduziert. Nach raschem Abkühlen kristallisiert das Zinndoppelsalz aus.

b) Synthese über das Anil (nach PREUSS & VOIGT 1965)

14 g 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon-5 wurden unter Zusatz von 1 ml 20%iger Sodalösung in 110 ml heißem Äthanol und 12 g p-Nitroso-NN'-dimethylanilin ebenfalls in 100 ml heißem Äthanol gelöst. Mischung der heißen Lösungen und Filtration mit Hilfe eines Heißwassertrichters. Umkristallisation des über Nacht ausgefallenen Anils mit reichlich Äthanol.

6 g Anil wurden in 300 ml Benzol gelöst und mehrmals für einige Stunden mit 15%iger Schwefelsäure ausgeschüttelt. Die Benzolphase, die dann keine Violettfärbung mehr aufweisen darf, wurde sulfatfrei gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und vom Benzol befreit. Reinigung des Präparats siehe unten!

c) Synthese über die Methylrubazonsäure (EMERSON & BEEGLE 1943)

10 g 4-Aminoantipyrin wurden in 350 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 8,8 g Norphenazon + 2,0 g NaOH in 50 ml Wasser gemischt. Als Oxydationsmittel wurden 66 g Kaliumferricyanid mit 7,8 g Natriumcarbonat in 200 ml Wasser gelöst hinzugegeben. Die ausfallende Methylrubazonsäure wurde wiederholt in Wasser suspendiert und abgenutscht. Trockengewicht 12 g. Umkristallisation aus Methanol.

152 mg Methylrubazonsäure wurden nach Überschichten mit 10 ml Äther 1 h lang mit 2,5 ml 6 n-Schwefelsäure auf dem Magnetrührer hydrolysiert.

Der Ansatz wurde anschließend mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt gewaschen (mit H_2O), über Calciumchlorid getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Zur Reindarstellung von 4,5-Dioxopyrazolin erfolgte bei allen Synthesewegen anschließend eine Sublimation (105°C, 10 mmHg) und Umkristallisation der Substanz aus Ligroin (KP 90-100°C).
Der Schmelzpunkt lag danach bei 119,5-121°C.

d) Synthese von 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxypyrazolon-5 (KNORR & PSCHORR 1896)

1,25 g Dioxopyrazolinbisulfit in 10 ml Wasser wurden mit 11 g 3%igem Natriumamalgam (55 g Hg + 1,5 g Na) versetzt. Die Lösung muß mit Eisessig stets sauer gehalten werden. Abscheidung von 992 mg 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-oxo-pyrazolin als gelblich-weißer körniger Niederschlag. 300 mg davon wurden aus heißem Wasser umkristallisiert. Im Filtrat fallen weiße Kristalle aus (größere Menge eines gelblichen Filterrückstandes). Ausbeute 170 mg.
Schmelzpunkt 163-168°C.

2. Reaktion von 4,5-Dioxopyrazolin mit Aminosäuren (STAHL)

Die Aminosäuren Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Pro, Ser, Thre, Cys-SH, Meth, Asp, Glu, Lys, Arg und His wurden in 10%iger Propanollösung, Tyr und Cys-S-S-Cys in 0,1 n-HCl gelöst (1 mg/ml). Ca. 1 mcl jeder Lösung wurde auf Kieselgelplatten aufgetragen und diese in einem Gemisch aus Propanol: Wasser 70: 30 entwickelt.

Als Sprühreagenz diente eine Lösung von

20 mg 4,5-Dioxopyrazolin in 5 ml Isopropanol
+ 100 mg Zinkacetat in 5 ml Wasser
+ 0,1 mg Pyridin

Die Platten wurden anschließend innerhalb von 10 min auf 50°C erwärmt. Dabei zeigten sich Farbreaktionen bei Gly, Ala, Leu, Ileu, Ser, Thre, Meth, Glu, Lys und His. Bei Erwärmung auf 100°C traten nach 20 min bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Pro unspezifische gelbbraune bis braunviolette Farbreaktionen auf.

3. Reduktionsproben mit 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin

a) Reaktion mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid:

1 ml einer 4%igen Lösung von TTC in Methanol wurde mit dem gleichen Volumen einer methanolischen NaOH-Lösung (gesättigt) gemischt. Hierzu wurde eine wässerige oder methanolische Lösung von 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin (1 Spatelsptze ≙ 0,5 mg in 2-3 ml Methanol) gegeben. Es trat sofort eine orangerote bis lachsfarbene Färbung auf. Nach ausreichendem Verdünnen mit Wasser (ca. 10 ml) kann der Farbstoff z.B. in Chloroform umgeschüttelt werden. Die Farbe wird dabei zunehmend rosa- bis karminrot, je nach der Menge der verwendeten Reagentien.
Mit 4,5-Dioxopyrazolin fällt diese Reaktion negativ aus.

b) Reaktion mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol (TILLMANS-Reagenz)

Eine Spatelspitze Dichlorphenolindophenol (ca. 0,5 mg) wurden in 10 ml Wasser mit blauer Farbe gelöst (Na-bikarbonat stabilisiert). 2 ml davon wurden mit 1 Tropfen n/10-HCl angesäuert (Farbumschlag nach rot; Farbintensität: durchsichtig). Zu dieser Lösung wurde jetzt tropfenweise die wässerige Lösung von 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin zugegeben.

Dabei bildeten sich hellere Schlieren, die sich langsam ausdehnten und die rote Farbe der Lösung langsam zum Verschwinden brachten. Beim Umschütteln wurde die Lösung wieder einheitlich rosa unter deutlicher Abschwächung der anfänglichen Farbintensität. Nach 1-2 min trat beim Stehenlassen eine vollständige Entfärbung ein.
Auch hier negativer Reaktionsausfall mit 4,5-Dioxopyrazolin.

c) Reaktion mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz:

Eine Spatelspitze (etwa 0,5 mg) 4-Hydroxy-5-oxo-pyrazolin wurde in 5 ml Wasser geschüttelt und wenigstens teilweise in Lösung gebracht. Erhitzen oder längeres Stehenlassen zur vollständigen Lösung wurde wegen der Sauerstoffempfindlichkeit der Substanz vermieden. Zu 2 ml der Lösung wurden 1-2 gtt. FOLIN-Reagenz (Merck Nr. 9001, Verdünnung 1:10) gegeben. Es trat sofort Blaufärbung auf.
4,5-Dioxopyrazolin zeigte beim gleichen Versuch keine Reaktion.

d) Reaktion mit Silbernitrat:

2 ml einer wässerigen Silbernitratlösung (1%) wurden mit 2 ml einer Lösung von 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin gemischt. Es trat sofort eine violette Farbe auf, die rasch nach Schwarz überging. Nach kurzer Zeit setzte sich ein feiner schwarzer Niederschlag von metallischem Silber ab.

e) Reaktion mit Jodlösung:

5 ml einer wässerigen Kaliumjodidlösung (ca. 4%) wurde mit 2 Kriställchen elementaren Jods versetzt und dieses unter Umschütteln gelöst. Von der erhaltenen braunen Jodlösung wurden tropfenweise 2-3 Tropfen zu einer wässerigen (bzw. wässrig-methanolischen) Lösung von 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin gegeben. Es trat eine sofortige Entfärbung des Jods ein.

4. Prüfung von 4-Hydroxy-5-oxopyrazolin auf Endiolstruktur

Eine Spatelspitze (etwa 1 mg) 1-Phenyl-3-methyl-4-hydroxy-5-oxopyrazolin wurde in 2 ml Methanol gelöst und mit 2 gtt. Pyridin versetzt. Dazu wurden 1-2 gtt. einer 5%igen mit Wasser verdünnten Titan-III-chlorid-Lösung gegeben. Es bildete sich ein schwarzbrauner bis schwarzvioletter Niederschlag, der sich jedoch unter Entwicklung einer kennzeichnenden braun- bis orangeroten, relativ intensiven Färbung, die einige Zeit (ca. 1 h) beständig blieb, wieder löste.

Bei Verwendung von Ascorbinsäure entwickelte sich eine ähnliche sattorangerote Farbe.

LITERATURVERZEICHNIS

AUWERS, K.
Untersuchungen über Oxyazokörper und Ketohydrazone.
II. Über das 1-Phenyl-3-methyl-4-benzolazo-5-oxypyrazol.
Liebigs Ann. Chem. 378, 218-243 (1911).

AXELROD, J.
Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines.
Physiol. Rev. 39, 751-776 (1959).

BANERJEE, R.K. and ROY, A.B.
The sulfotransferases of guinea-pig liver.
Molec. Pharm. 2, 56-66 (1966).

BELMAN, S. and TROLL, W.
The interaction of 2-amino-1-naphthol with bovine serum albumine and cytochrome C in relation to its effect on rat bladder.
J. biol. Chem. 237, 746-750 (1961).

BERGMEYER, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1962.

BERNOULLI, E., GORDONOFF, T. und LEHMANN, H.
Übersicht der gebräuchlichen und neueren Arzneimittel.
12. Aufl., Schwabe & Co. Verlag, Basel/Stuttgart 1967.

BICKEL, M.H., FLÜCKIGER, M. und BAGGIOLINI, M.
Vergleichende Demethylierung von tricyclischen Psychopharmaka durch Rattenleber-Mikrosomen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 256, 360-366 (1967).

BÖCK, J., KAUNITZ, H. und POPPER,
Zur Wirkung von Pyrazolonderivaten auf die Gefäße.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 179, 170-179 (1935).

BOYLAND, E., KINDER, C.H. and MANSON, D.
The biochemistry of aromatic amines.
8. Synthesis and detection of Di-(2-amino-1-naphthyl) hydrogen phosphate, a metabolite of 2-naphthylamine in dogs.
Biochem. J. 78, 175-179 (1961)

BRODIE, B.B. and Axelrod, J.
The fate of acetophenetidine in man and methods for the estimation of acetophenetidine and its metabolites in biological material.
J. Pharmacol. exp. Ther. 97, 58-67 (1949).

BRODIE, B.B. and AXELROD, J.
The fate of antipyrine in man.
J. Pharmacol. exp. Ther. 98, 97-104 (1950).

BRODIE, B.B. and AXELROD, J.
The fate of aminopyrine in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material.
J. Pharmacol. exp. Ther. 99, 171-184 (1950).

BRODIE, B.B. and MAICKEL, R.P.
Comparative biochemistry of drug metabolism.
Proc. 1. Intern. Pharmacol. Meeting, Stockholm 1961.
Editor: B. UVNÄS, Vol. VI, 299-324 (1962)

BRUNS, F., HAHN, F. und SCHILD, W.
Untersuchungen zur Pharmakologie der Wärmeregulation.
1. Mitteilung: Über den Wirkungsmechanismus und die Angriffspunkte der Narkotika, Krampfgifte und Antipyretika.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 209, 104-137 (1950)

CLARK, U.M., KIRBY, G.W. and TODD, A.R.
Oxidative phosphorylation: a chemical approach using quinolphosphates.
Nature 181, 1650-1652 (1958).

DE EDS, F., BOOTH, A.N. and JONES, F.T.
Methylation of phenolic hydroxyl groups by rabbit.
Fed. Proc. 14, 332 (1955).

DOMENJOZ, R.
Pharmakotherapeutische Weiterentwicklung der Antipyretica-Antalgetica.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 225, 14-44 (1955)

DUTTON, G.J.
Glucuronid Acid - free and combined.
Academic Press, New York / London 1966.

EMERSON, E. and BEEGLE, L.C.
The condensation of aminoantipyrine.
III. (1). The synthesis of methylrubazoic acid.
J. org. Chemistry 8, 429-432 (1943).

v.EULER, H. und EISTERT, B.
Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate.
Enke Verlag, Stuttgart 1957.

FILEHNE, W.
Über das Pyramidon, ein Antipyrinderivat.
Berl. Klin. Wschr. 48, 1061-1063 (1896).

FRIMMER, M. und KRYCH, G.
Unbeeinflußbarkeit der permeationsfördernden Wirkung von Bradykinin durch Antiphlogistica.
Med. Exp. 9, 99-101 (1963).

GARTON, G.A. and WILLIAMS, R.T.
Studies in Detoxication.
17. The fate of catechol in the rabbit and the characterization of catechol monoglucuronide.
Biochem. J. 43, 206-211 (1948).
21. The fates of quinol and resorcinol in the rabbit in relation to the metabolism of benzene.
Biochem. J. 44, 234-238 (1949)

GILLETTE, J.R.
Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms.
Fortschritte der Arzneimittelforschung 6, 11-73 (1963).

GILLETTE, J.R.
Comments on comparative patterns of drug metabolism.
Fed. Proc. 26, 1040-1043 (1967).

GILLETTE, J.R., DINGELL, J.V., SULSER, F., KUNTZMAN, R. and BRODIE, B.B.
Isolation from rat brain of a metabolic product, desmethyl-imipramine, that mediates the antidepressant activity of imipramine.
Experientia 17, 417-418 (1961).

GREGORY, J.D.
Sulfate conjugation.
Proc. 1. Intern. Pharmacol. Meeting, Stockholm 1961
Editor: B. UVNÄS, Vol. VI, 53-64 (1962).

GUTMAN, H.R., NAGASAWA, H.T.
The oxidation of o-aminophenols by cytochrome C and cytochrome C oxidase.
J. biol. Chem. 235, 466-471 (1960).

HALBERKANN, J. und FRETWURST, F.
Die Stoffwechselprodukte des Pyramidons und verwandter Verbindungen beim Menschen.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 285, 97-127 (1950).

HARPER, N.J.
Drug Latentiation.
Fortschritte der Arzneimittelforschung 4, 221-294 (1962).

HARRISON, K.
A theory of oxidative phosphorylation.
Nature 181, 1131 (1958).

HEILMEYER, L.
Rezepttaschenbuch.
10. Aufl., Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1956.

HERBERT, R.W., HIRST, L., PERCIVAL, E.G.V., REYNOLDS, R.J.W. and SMITH, F.
The constitution of ascorbic acid.
J. chem. Soc. 1933/II, 1270-1290.

HERXHEIMER, H. und STRESEMANN, E.
Anti-Asthmatic effect of phenazone and amidopyrine.
Nature 192, 1089-1099 (1961).

HIDETOSHI YOSHIMURA, SHIMENO, H., HISAO TSUKAMOTO
Metabolism of drugs LIX. A new metabolite of antipyrine.
Biochem. Pharm. 17, 1511-1516 (1968).

HOLTZ, P. und TRIEM, G.
Über Peroxydbildung bei der Autoxydation von Ascorbinsäure und Sulfhydrylkörpern.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 248, 1-4 (1937).

JAFFE, M.
Über den nach Pyramidongebrauch im Harn auftretenden rothen Farbstoff.
Chem. Ber. 34, 2737-2741 (1901).

KAMIL, J.A., SMITH, J.N., and WILLIAMS, R.T.
Studies in detoxication.
41. A study of the optical rotations of the amides and triacetyl methyl esters of some biosynthetic substituted phenylglucuronides.
Biochem. J. 50, 235-240 (1952).

KERP, L. u. KASEMIR, H.
Untersuchungen zur Antigenspezifität bei Arzneimittelallergien
Festschrift L. Heilmeyer 65 Jahre, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1964.

KLAGES, F.
Lehrbuch der organischen Chemie III. Band.
Walter de Gruyter-Verlag, Berlin 1958.

KNORR, L.
Synthetische Versuche mit dem Acetessigester.
III. Mittheilung: Überführung des Acetessigesters in Pyrazolderivate.
Liebigs Ann. Chem. 238, 137-219 (1887).

KNORR, L. und PSCHORR, R.
Verfahren zur Darstellung von 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-oxy-5-pyrazolon.
Fortschritte der Theerfarbenfabrikation (Friedländer) 3, 941-943 (1896).

KOBERT, R.
Beiträge zur Kenntnis einiger Pyrazolonderivate.
Z. klin. Med. 62, 57-99 (1907).

KRAYCHY, S. and GALLAGNER, T.F.
2-methoxyestrone, a new metabolite of estradiol-17-β in man.
J. biol. Chem. 229, 519-526 (1957).

KROHS, W. und HENSEL, O.
Pyrazolone und Dioxopyrazolidine.
Editio Cantor, Aulendorf i. Württ. 1961.

KUHN, R. und JERCHEL, D.
Über Invertseifen. VIII. Mitteilung: Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen.
Chem. Ber. 74, 949-952 (1941).

LAUBENDER, W.
Über die Unterdrückbarkeit der Acetylcholin- und Rhodanidkontraktur durch Pyrazolonderivate.
Med. Exp. 3, 1-8 (1960).

LAWROW, D.
Über die Ausscheidung des Antipyrins im thierischen Organismus.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 32, 111-120 (1901).

LECOMTE, J.
Sur l'activité anti-anaphylactique des dérivés de la pyrazolone chez le lapin.
Arch. int. Pharmacodyn. 161, 463-476 (1966).

MAHLER, H.R. and CORDES, E.H.
Biological Chemistry.
A. Harper International Edition, New York 1966.

MARKS, F. und HECKER, E.
Darstellung biochemisch interessanter Thioäther der Oestrogene.
I. 2- und 4-carboxymethylmercapto-oestron-3-methyläther.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 349, 1208-1214 (1968).

MARKS, F., KUBINYI, E. und HECKER, E.
Darstellung biochemisch interessanter Thioäther der Oestrogene.
II. 2-methoxy-4-carboxymethylmercapto-oestron-3-methyläther.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 349, 1215-1220 (1968).

MAYER, R.L.
Die Beziehungen zwischen toxischen, allergischen und carcinogenen Eigenschaften aromatischer Amine. Gruppenüberempfindlichkeit gegen Körper von Chinonstruktur.
Klin. Wschr. 36, 885-893 (1958).

McCALDIN, D.J.
The chemistry of ninhydrine.
Chem. Rev. 60, 39 (1960).

MILLER, E.C. and MILLER, J.A.
Mechanisms of chemical carcinogenesis:
Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules.
Pharmacol. Rev. 18, 805-838 (1966).

NEGWER, M.
Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma.
3. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin 1966.

PECHTOLD, F.
Die Methylrubazonsäure als Oxydationsprodukt des 4-Aminophenazons.
Arzneimittel-Forsch. 14, 474-475 (1964).

PECHTOLD, F.
Zur Kenntnis des Abbaues von Dimethylaminophenyldimethylpyrazolon im Organismus.
Arzneimittel-Forsch. 14, 972-974 (1964).

PREUSS, F.R. und VOIGT, K.M.
Über die Vorstufen und die Bildung der Methylrubazonsäure nach Einnahme von Amidopyrin.
Arzneimittel-Forsch. 15, 741-747 (1965).

PRICE, J.M. and DODGE, L.W.
Occurrence of the 8-methyl ether of xanthurenic acid in normal human urine.
J. biol. Chem. 223, 699-704 (1956).

REMMER, H. und SCHÜPPEL, R.
Formation of antigenic determinants.
Intern. Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics,
Section 75, Pergamon-Press, 1968.

REMMER, H., GREIM, H., SCHENKMAN, J.B. and ESTABROOK, R.W.
Methods for the elevation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrome P 450.
Methods in Enzymology Vol. X, 703-708 (1967).

RICHARZ, G., SCHOETENSACK, W. und VOGEL, M.
Verteilung und Ausscheidung von 1-Phenyl-2, 3-dimethyl-4-isopropylamino-pyrazolon (Isopyrin) sowie von Phenylbutazon bei der Ratte.
Arzneimittel-Forsch. 10, 676-683 (1960).

RIMINGTON, C.
Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins.
Biochem. J. 34, 931-940 (1940).

ROTHGANG, H.
Spezialitäten-Praktikum.
1. Aufl., J.F. Lehmann-Verlag, München 1961.

SCHALES, O1
Empfindliche Methoden zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd und seiner Entstehung bei einigen Dehydrierungsvorgängen.
Chem. Ber. 71, 447-460 (1938).

SCHÜPPEL, R.
Die Stickstoff-Demethylierung am Phenazon (Antipyrin^{R}).
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 255, 71 (1966).

SCHÜPPEL, R.
Das Verhalten einiger Konjugationsreaktionen im Arzneistoffwechsel der Ratte bei akuter Äthanolbelastung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. (1969) im Druck.

SCHÜPPEL, R. und SOEHRING, K.
Qualitative Untersuchungen über den Amidopyrin-Stoffwechsel beim Menschen.
Pharm. Acta Helv. 40, 105-124 (1965).

SMITH, C.C.
Comments on comparative patterns of drug metabolism.
Fed. Proc. 26, 1044-1046 (1967).

SMITH, J.N. and WILLIAMS, R.T.
Studies in detoxication.
22. The metabolism of phenacetine (p-ethoxyacetanilide) in the rabbit and a further observation on acetanilide metabolism.
Biochem. J. 44, 239-242 (1949).

STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.
2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.

THEOBALD, W. und DOMENJOZ, R.
Das Serotonin-Oedem der Ratte und seine Beeinflussung durch Antiphlogistica.
Arzneimittel-Forsch. 8, 18-19 (1958).

THIERFELDER, S., MAGIS, C., SAINT-PAUL, M. und DAUSSET, J.
Die Pyramidon-Agranulocytose.
Dtsch. med. Wschr. 89, 506-512 (1964).

THIERFELDER, S., EULITZ, M. und KARL, M.L.
Immunologische Studien an einem Pyramidon-Leukocytenantikörper.
Klin. Wschr. 45, 78-83 (1967).

TOMEK, S.
Neue Betrachtungen über Angriffs- und Wirkungsweise der Pyrazolonpräparate.
Arzneimittel-Forsch. 5, 53-60 (1955)

TROLL, W., BELMAN, S. and NELSON, N.
Aromatic amines III.
Note on BIS-(2-amino-1-naphthyl)-phosphate, urinary metabolite of 2-naphthyl-amine.
Proc. Soc. exp. Biol. 100, 121-122 (1959).

UEHLEKE, H.
N-hydroxylation of arylamines by bladder mucosa.
Life Sci. Oxford 5, 1489-1494 (1966).

VARGAFTIG, B.B.
Antagonisme par les analgésiques nonnarcotiques de la libération de kinines plasmatiques due au venin de B. jararaca et la kallikréine pancreatique.
Med. Pharmacol. exp. 17, 517-526 (1967).

VECERKOVA, J., KAKAC, B., VECEREK, B. und LEDVINA, M.
Die Anwendung papierchromatographischer Methoden zum toxikologischen Nachweis von Arzneimitteln.
8. Mitteilung: Neue Erkenntnisse über den Abbau des Aminophenazons.
Pharmazie 22, 30-38 (1967).

VEIBEL, S.
Analytik organischer Verbindungen.
Akademie-Verlag, Berlin 1960.

WANZLICK, H.W.
Synthesen mit naszierenden Chinonen.
Angew. Chemie 76, 313-320 (1964).

WEISBURGER, J.H. and WEISBURGER, E.K.
Pharmacodynamics of carcinogenic azo dyes, aromatic amines, and nitrosamines.
Clin. Pharmacol. Therap. 4/1, 110-129 (1963).

WHITEHOUSE, M.W.
Some biochemical and pharmacological properties of antiinflammatory drugs.
Fortschritte der Arzneimittelforschung 8, 321-429 (1965).

WIELAND, Th. und PATTERMANN, F.
Synthese der Monophosphorsäureester von Hydrochinon und Naphthohydrochinon-(1,4).
Chem. Ber. 92, 2917-2926 (1959).
Modellreaktion zur oxydativen Phosphorylierung.
Angew. Chemie 70, 313-314 (1958).

WILHELMI, G. und PULVER, R.
Untersuchungen zur Frage eines peripheren Angriffspunktes der Pyrazole bei der antiphlogistischen Wirkung.
Arzneimittel-Forsch. 5, 221-224 (1965).

WILLIAMS, R.T.
Detoxication mechanisms.
Chapman and Hall Ltd., London 1959.

WILLIAMS, R.T.
Drug metabolism in man as compared with laboratory animals.
Proceed. European Soc. Study Drug Toxicity IV, 9-23 (1964).

WILLIAMS, R.T.
Comparative patterns of drug metabolism.
Fed. Proc. 26, 1029-1039 (1967).

WINTER, Ch.A.
Nonsteroid anti-inflammatory agents.
Ann. Rev. Pharmacol. 6, 157-174 (1966).

ZICHA, L., SCHEIFFARTH, F., SCHMID, E. ALMS, U. und SCHOTT, G.
Untersuchungen über antagonistische Effekte verschiedener Antiphlogistica sowie Muskelrelaxantien gegen Histamin und Serotonin.
Arzneimittel-Forsch. 11, 598-602 (1961).

Herrn Prof. Dr. H. Remmer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. R. Schüppel für die unermüdliche, großzügige und verständnisvolle Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Am 4. August 1944 wurde ich, Gerhard Wittemann, als Sohn des Steuerberaters Gebhard Wittemann und seiner Ehefrau Margaretha, geb. Schmälzlin, in Lörrach geboren.

Nach 4jähriger Volksschulzeit in Stuttgart trat ich im April 1954 in das Dillmann-Gymnasium in Stuttgart ein und erhielt dort im März 1963 das Reifezeugnis.

Im Sommersemester 1963 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Im Oktober 1965 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung. Das klinische Studium verbrachte ich in Hamburg und Tübingen. Im Februar 1969 legte ich in Tübingen das Medizinische Staatsexamen ab.

1968 heiratete ich Fräulein Roswitha Eisert. Im selben Jahr wurde unsere Tochter Nicola geboren.